

Synthese und Eigenschaften heteroaromatischer Oligoamide zur molekularen Erkennung von DNS und Peptiden

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät –

Chemie und Pharmazie –

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Hans-Christoph Gallmeier

aus Regensburg

2002

Synthese und Eigenschaften heteroaromatischer Oligoamide zur molekularen Erkennung von DNS und Peptiden

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der naturwissenschaftlichen Fakultät IV

– Chemie und Pharmazie –

der Universität Regensburg



vorgelegt von

Hans-Christoph Gallmeier

aus Regensburg

2002

Diese Arbeit wurde angeleitet von *Prof. Dr. B. König*

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 13. November 2002

Das Kolloquium fand statt am: 20. Dezember 2002

Prüfungsausschuß: Prof. Dr. G. Schmeer (Vorsitzender)

Prof. Dr. B. König (Erstgutachter)

Prof. Dr. A. Geyer (Zweitgutachter)

Prof. Dr. J. Daub

Der experimentelle Teil dieser Arbeit entstand in der Zeit von Dezember 1999 bis Juni 2002 am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Burkhard König

für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und das stets mit Anregungen und Diskussionen verbundene Interesse an dieser Arbeit.

*Meiner Familie
und
Steffi*

A	Einleitung	1
1	Natürliche und künstliche heteroaromatische Oligoamide mit sequenz-spezifischer dDNS-Affinität	1
1.1	Natürliche heteroaromatische Oligoamide	1
1.2	Künstliche heteroaromatische Oligoamide	2
2	Prinzipien der Verknüpfung heteroaromatischer Oligoamide	8
3	Schlussfolgerung und Ausblick	21
B	Hauptteil	23
1	Immobilisierte Oligoamide mit sequenzspezifischer dDNS-Affinität	23
1.1	Natürliche heteroaromatische Oligoamide als Affinitätsliganden für eine chromatographische Trennung von dDNS	23
1.1.1	Einführung	23
1.1.2	Monomer-Synthese	24
1.1.3	Synthese am polymeren Träger	25
1.1.4	Immobilisierung des Oligoamids auf einem polymeren Träger	29
1.1.5	Untersuchung der Bindungseigenschaften des funktionalisierten Polymers Fractogel-Gly-(Py) ₄ -β-Dp an Plasmid-dDNS	30
1.2	Wege zur Entwicklung eines Biosensors für die sequenzspezifische Erkennung von dDNS in Lösung	32
1.2.1	Einführung	32
1.2.2	Festphasensynthese	33
1.2.3	Immobilisierung und Bindungseigenschaften	34
2	Synthese und Eigenschaften eines potentiell sequenzspezifisch dDNS-hydrolysierenden Kobalt(III)-Cyclen Komplexes	36
2.1	Einführung	36
2.2	Synthese des Kobalt(III)-Cyclen Komplexes	39
3	Molekulare Erkennung von Naturstoffen mit Imid-Einheiten durch polymergebundenes Zink(II)-Cyclen	42
3.1	Einführung	42
3.2	Synthese von polymergebundenem Zink(II)-Cyclen	43
3.3	Molekulare Erkennung von Vitamin B ₂	44
3.3.1	Bindung von Riboflavin bzw. Riboflavintetraacetat an Verbindung 84	44
3.3.2	Quantitative Bestimmung von Riboflavin in einer Vitamintablette	46

3.4 Molekulare Erkennung von Kreatinin	47
3.4.1 Einführung	47
3.4.2 Anreicherung von Kreatinin aus hochverdünnten Lösungen	49
4 Künstliche Rezeptoren zur Erkennung von β-Faltblattstrukturen in Peptiden	52
4.1 Einführung	52
4.2 Problemstellung und Konzeption	56
4.3 Darstellung von Pyrazol-Oligoamiden aus monomeren Bausteinen mit freiem Ringstickstoff	57
4.3.1 Versuch der Synthese in Lösung	57
4.3.2 „Liquid Phase“ Synthese von Pyrazol-Oligoamiden an Polyethylenglycol Monomethylether als Trägermaterial	65
4.4 Chirale Pyrazol-Oligoamide	69
4.4.1 Einführung	69
4.4.2 Monomer-Synthese	70
4.4.3 Festphasensynthese	72
4.4.4 ^1H -NMR- und Bindungsstudien	77
4.5 Synthese eines Rezeptors mit Pinzettenstruktur	83
4.5.1 Einführung	83
4.5.2 Synthese	85
4.5.3 ^1H -NMR- und Bindungsstudien	89
4.6 Schlussfolgerung und Ausblick	92
C Zusammenfassung	95
D Experimenteller Teil	99
1 Allgemeines	99
2 Synthese	104
2.1 Allgemeine Versuchsvorschriften	104
2.2 Darstellung der Verbindungen	110
E Abkürzungsverzeichnis	144
F Literaturverzeichnis	147
G Anhang	167

A Einleitung

1 Natürliche und künstliche heteroaromatische Oligoamide mit sequenzspezifischer dDNS-Affinität

1.1 Natürliche heteroaromatische Oligoamide

Alle bekannten lebenden Organismen, mit Ausnahme einiger spezieller Viren, speichern ihre genetische Information in Form einer Desoxyribonucleinsäure-Doppelhelix (dDNS).¹⁻⁴ Der biochemische Zugang zu diesen Daten beruht auf spezifischen Protein-dDNS Wechselwirkungen, die sowohl reversibel als auch irreversibel sein können. Im erst genannten Fall werden grundsätzlich drei Klassen von Interaktionen unterschieden.⁵⁻⁷ Dies sind zum einen elektrostatische Wechselwirkungen, zum anderen die Interkalation sowie die Bindung in der kleinen beziehungsweise großen Furche der dDNS.

Klassische Interkalatoren wie z.B. das Ethidiumbromid, die ihren aromatischen Ring zwischen zwei Basenpaare einer dDNS insertieren,⁸ weisen nur eine geringe Sequenzspezifität auf. Die Mehrzahl der bisher untersuchten organischen Moleküle, die charakteristischerweise ein Molekulargewicht von weniger als 1500 Dalton besitzen,⁹ assoziieren mit Doppelstrang-DNS in deren kleiner Furche. Formal lässt sich letzterer Prozess in zwei hypothetische Schritte gliedern.¹⁰ Im ersten Schritt wird der Ligand aufgrund elektrostatischer sowie hydrophober Wechselwirkungen mit der entsprechenden dDNS aus der Lösung in die kleine Furche dieser Doppelhelix transferiert. Im Fall des Distamycin-Moleküls, einer positiv geladenen Verbindung, wird dabei gleichzeitig ein positiv geladenes Gegenion aus der dDNS freigesetzt. Im zweiten Schritt kann das eingelagerte Substrat dann eine Vielzahl molekularer Wechselwirkungen mit der dDNS eingehen. Die sequenzspezifische Bindung ist dabei im Allgemeinen von einer Kombination aus Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen sowie van der Waals Kontakten abhängig.⁵

Die aus zwei beziehungsweise drei *N*-Methylpyrrolcarboxamiden aufgebauten Peptide Netropsin¹¹ und Distamycin¹² (Abbildung 1) zeigen Aktivität gegenüber speziellen Tumoren, Bakterien und Viren^{13,14} und waren die ersten entdeckten Naturstoffe, die

selektiv an AT-reiche Sequenzen in der kleinen Furche einer doppelhelicalen DNS binden.¹⁵

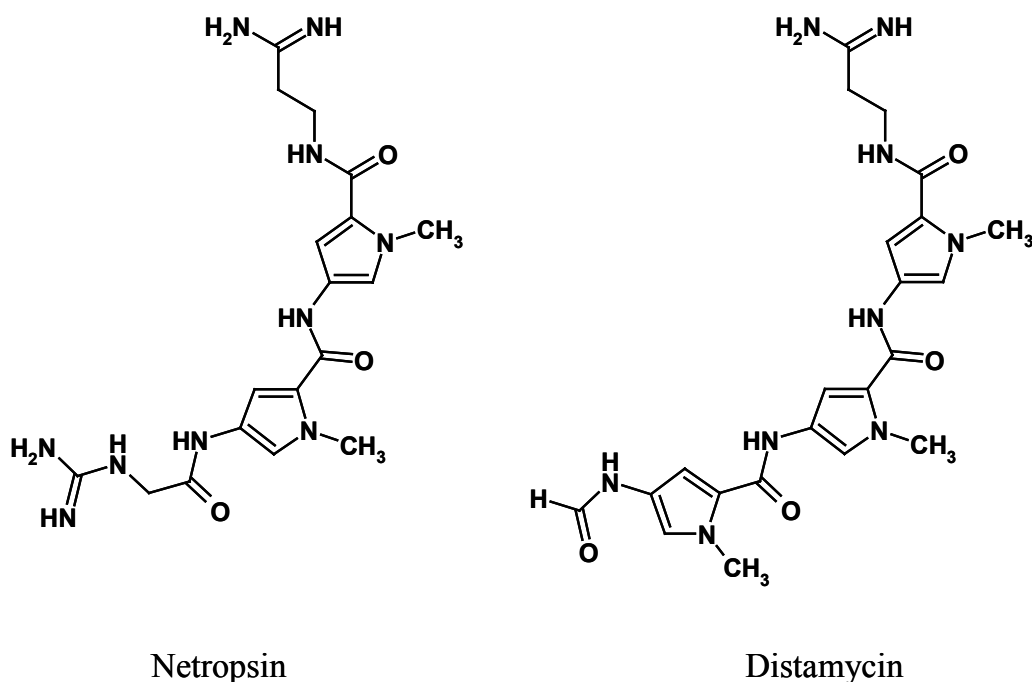


Abb. 1: Strukturen der Naturstoffe Netropsin und Distamycin.

Während das Netropsin mit einer geeigneten Desoxyribonucleinsäure in einer 1:1 Stöchiometrie bindet,¹⁶⁻¹⁸ kann das Distamycin sowohl einen 1:1 als auch einen 2:1 dDNS-Substrat Komplex ausbilden.¹⁹⁻²¹ Wie von *Wemmer* und Mitarbeitern durchgeführte NMR-Studien zeigen, ist die Art des Bindungsmotivs dabei sowohl von der Konzentration des Distamycin als auch von der Basenpaarabfolge in der verwendeten dDNS abhängig.^{22,23} Im Falle des 2:1 Komplexes lagern sich zwei Distamycin-Moleküle antiparallel in die kleine Furche der dDNS ein, so dass jeweils zwei gegenüberliegende *N*-Methylpyrrolcarboxamid-Einheiten spezifisch an ein AT-Basenpaar binden. Die *N*-Methylpyrrol-Ringe des einen gebundenen Oligoamids liegen dabei über den Peptidbindungen des anderen Oligoamidstranges.²²

1.2 Künstliche heteroaromatische Oligoamide

Auf der Basis dieser natürlichen Oligoamide gelang es der Arbeitsgruppe um *Dervan*, durch Variation der heterocyclischen Untereinheiten, selektiv alle vier *Watson-Crick*-Basenpaare zu erkennen (Abbildung 2).²⁴ Das Pyrrol (Py)/Imidazol (Im) Paar unterscheidet zwischen dem CG- und dem GC-Paar (umgekehrte Heterocyclenanordnung Py/Im) und trennt beide von AT bzw. TA.²⁵⁻²⁹ Mittels des

Paares Py/Py ist zwar eine Differenzierung zwischen AT und GC möglich, jedoch kann nicht zwischen den beiden Möglichkeiten AT und TA unterschieden werden.^{22,23,25-28,30,31}

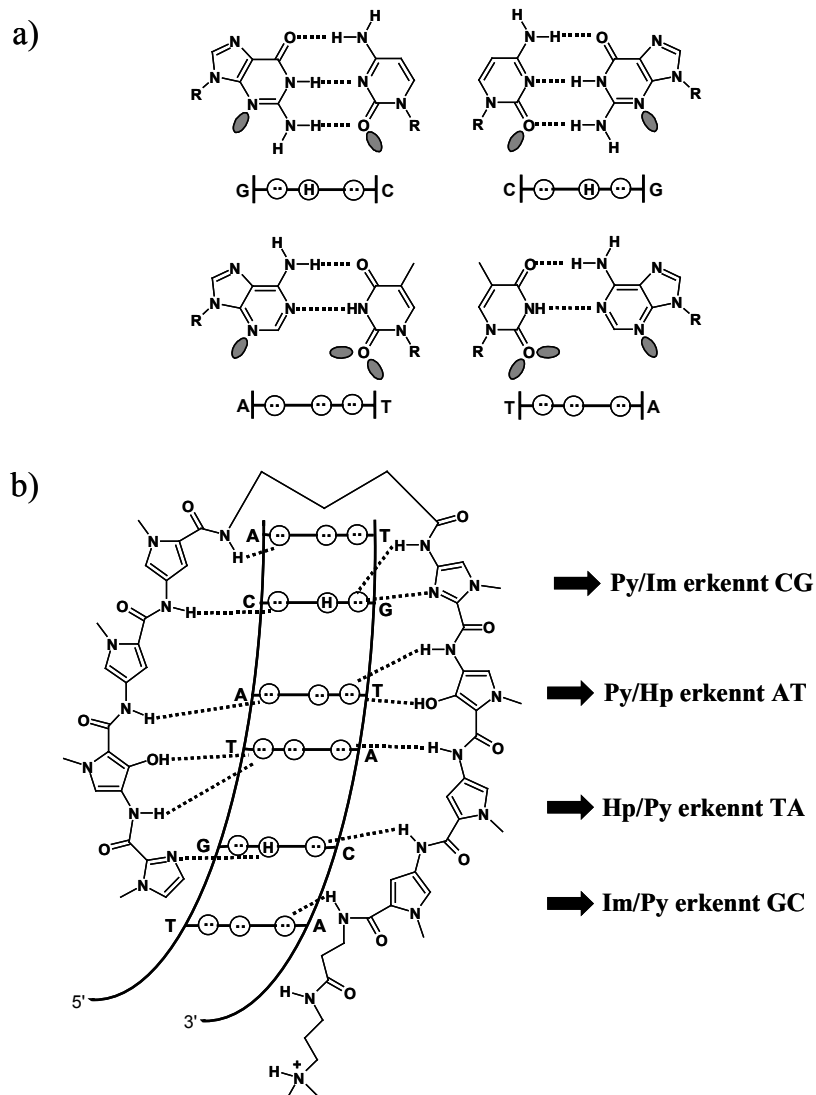


Abb. 2: Molekulare Erkennung in der kleinen Furche einer dDNS. (a) Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären *Watson-Crick*-Basenpaaren. Die eingekreisten Punkte symbolisieren die Ionenpaare des Stickstoffs N 3 der Purine bzw. des Sauerstoffs O 2 der Pyrimidine; eingekreiste H-Atome veranschaulichen die 2-Aminogruppe des Guanins; R kennzeichnet das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNS. (b) Bindungsmodell für einen Komplex aus einem Hairpin-Oligoamid und der 5'-TGTACA-3'-Sequenz einer doppelhelicalen DNS; die sich ausbildenden H-Brücken sind in Form gestrichelter Linien dargestellt.

Durch die Verwendung eines weiteren Bausteins, des 3-Hydroxy-*N*-methylpyrrols (Hp), konnte schließlich der vollständige Bindungscode für die Einlagerung dieser

heteroaromatischen Oligoamide in die kleine Furche der dDNS angegeben werden.³² Hp/Py bindet dabei das TA-, Py/Py das AT-Basenpaar (Abbildung 2).³³⁻³⁵

Die dDNS-bindenden Liganden bilden dabei Wasserstoffbrückenbindungen mit dem freien Elektronenpaar am Stickstoff N 3 der Purinbasen und den freien Elektronenpaaren am Sauerstoff O 2 der Pyrimidinbasen sowie der 2-Aminogruppe des Guanins aus.^{22,35}

Die selektive Erkennung aller vier *Watson-Crick* Basenpaare in der kleinen Furche einer DNS-Doppelhelix erlaubt eine vorhersagbare und gezielte Bindung spezifischer Basenpaar-Sequenzen. Das Design geeigneter zellpermeabler Moleküle auf der Basis von heteroaromatischen Oligoamiden eröffnet damit die Möglichkeit die Genexpression zu regulieren.³⁶⁻⁴²

Neben den bereits diskutierten *N*-Methylpyrrolen, *N*-Methylimidazolen bzw. *N*-Methylhydroxypyrrolen ist eine Vielzahl weiterer Fünfringheteroaromaten (Abbildung 3) in Oligoamiden eingebaut worden. Diese synthetischen Analoga der Naturstoffe Netropsin und Distamycin werden in der Literatur nach *Lown* auch als Lexitropsine bezeichnet.⁴⁴

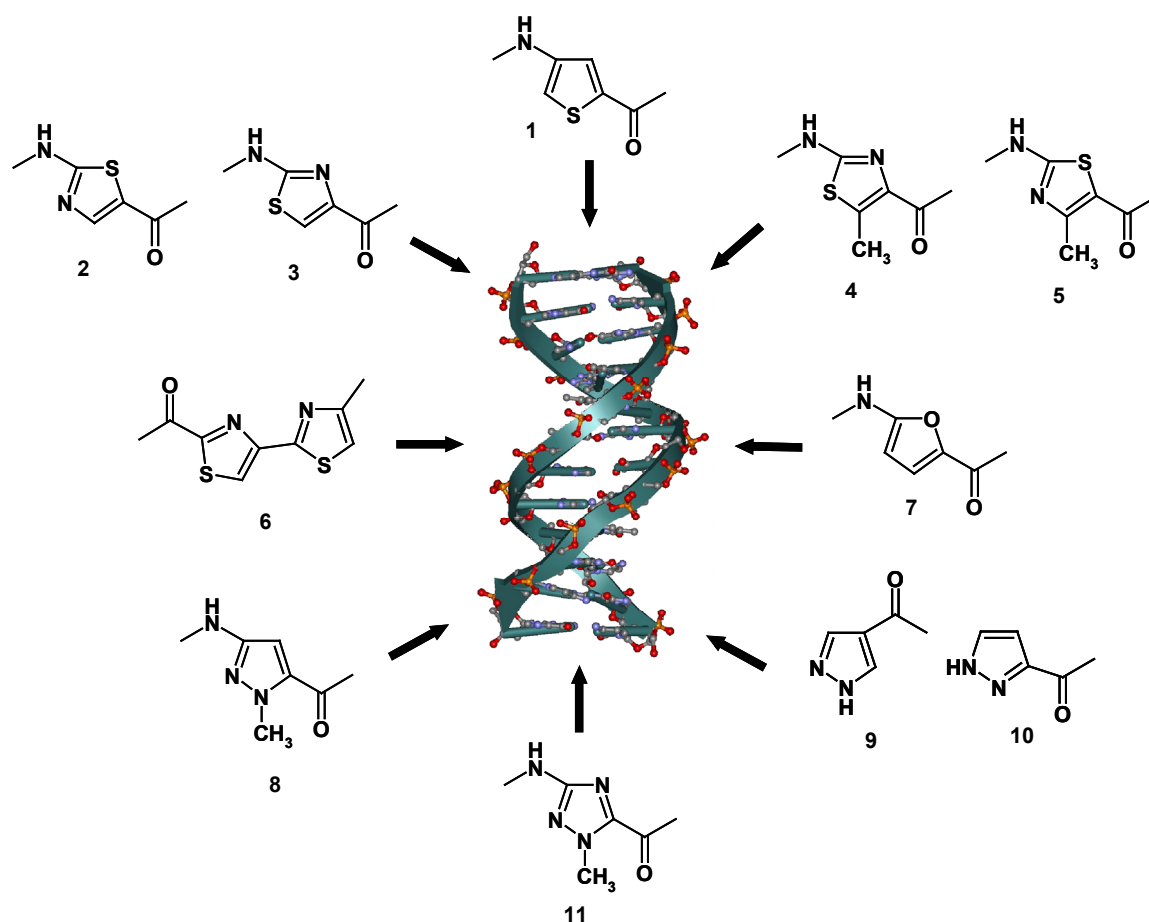


Abb. 3: Überblick über die in Lexitropsinen eingebauten heteroaromatischen Fünfringe.

Im Folgenden sollen einige Eigenschaften dieser neuen Naturstoff-Analoga anhand ausgewählter Vertreter der jeweiligen Heterocyclen-Klasse dargestellt werden. Bezüglich weiterer nicht explizit angeführter Verbindungen sei auf die angegebene Literatur verwiesen.

In einer von *Boger* und Mitarbeitern^{45,46} synthetisierten Bibliothek von 2640 Analoga des Distamycins zeigen zwei Amide, welche den Thiophen-Baustein **1** enthalten, interessante Eigenschaften. So wird bei dem Derivat **12** (Abbildung 4) gegenüber poly[dA]-poly[dT] DNS mit $2.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ die zweithöchste Bindungskonstante der 2640 dargestellten Verbindungen gemessen.⁴⁷ Des Weiteren zeigt die Verbindung **13** (Abbildung 4) in einem Assay zur Untersuchung der cytotoxischen Aktivität an L1210-Zellen eine 100-fach höhere Aktivität verglichen mit Distamycin A.⁴⁸

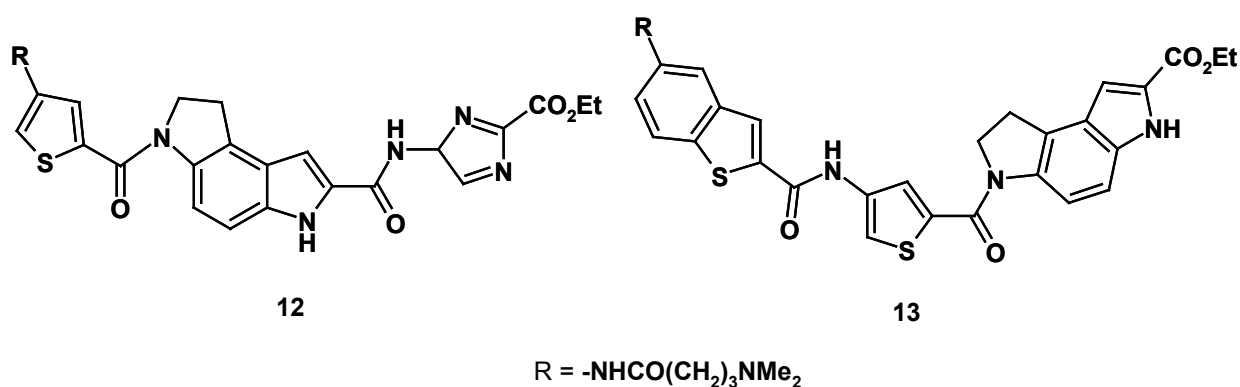


Abb. 4: Strukturformeln der Verbindungen **12** und **13**.

Oligoamide, welche die Thiazol-Bausteine **2**, **3**, **4** oder **5** (siehe Abbildung 3) enthalten zeigen zwei gegensätzliche Trends. In Abhängigkeit von der Position des Schwefels lassen sie entweder ein GC-Basenpaar in ihrer Bindungsstelle zu oder zeigen strikte AT Präferenz.⁴⁹⁻⁵² Das Derivat **14** (Abbildung 5), bei dem das Schwefel-Atom in Richtung der kleinen Furche einer DNS-Doppelhelix weist, bindet nicht an GC-Basenpaare. Die entsprechende Verbindung, bei der die Schwefel-Atome von der kleinen Furche wegzeigen (**15**, Abbildung 5), bindet am stärksten an alternierende Purin-Pyrimidin-Sequenzen wie z.B. 5'-TATGAC-3' und 5'-TATGAC-3'.^{53,54}

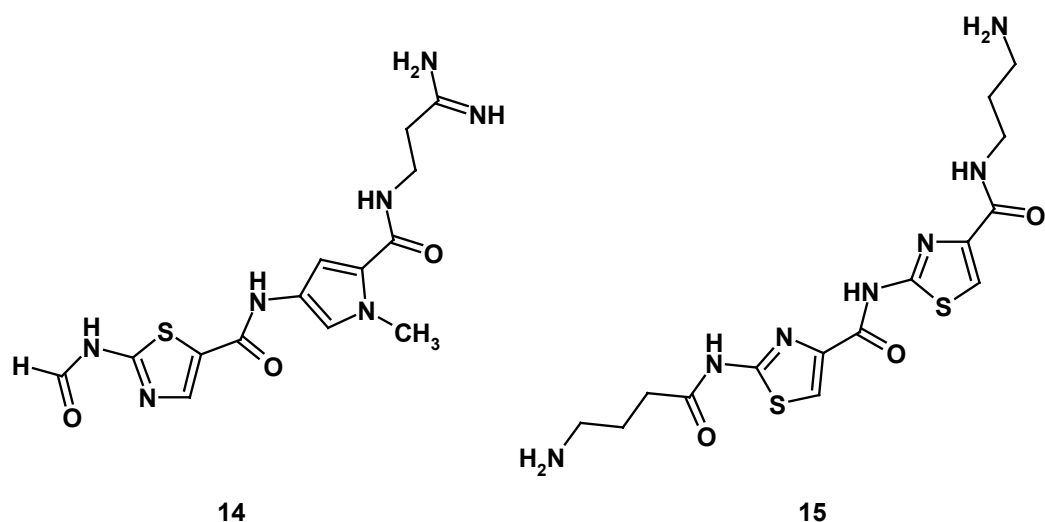


Abb. 5: Strukturformeln der Thiazol-Derivate 14 und 15.

Die Bis-Thiazol-Einheit **6** (siehe Abbildung 3) aus der Klasse der Antitumor-Derivate der Bleomycine⁵⁵ eröffnet die Möglichkeit an GC-Basenpaare zu binden. Der Netropsin-Teil der Verbindung **16** (Abbildung 6) dirigiert den Arzneistoff zu AT-reichen Stellen einer dDNS und ermöglicht anschließend dem angeknüpften Bis-Thiazol **6** an ein Pyrimidin-Guanin-Pyrimidin Motiv zu binden.^{56,57}

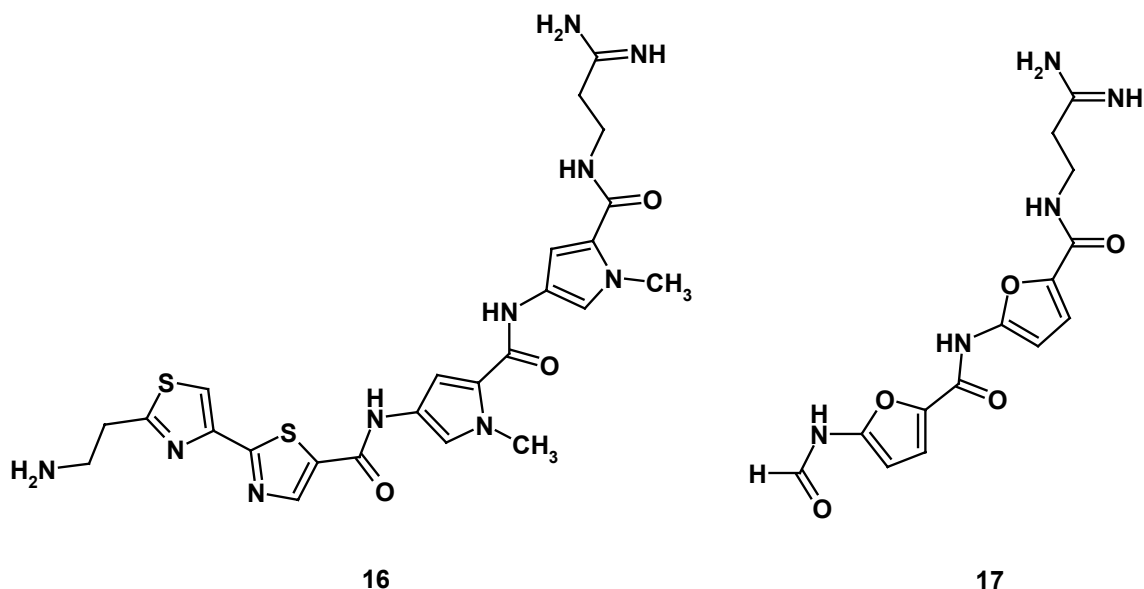


Abb. 6: Strukturformeln der Verbindungen 16 und 17.

Das Bis-2,5-disubstituierte Furan **17** (Abbildung 6) bindet an eine Sequenz von vier Basenpaaren. Hierbei wird ein GC-Paar an den Positionen 1, 2 oder 3 toleriert, wohingegen an der Position 4 ein AT-Basenpaar für eine Bindung benötigt wird.^{58,59}

Das Tallimustin (FCE24517)⁶⁰, ein Distamycin-Analogon, bei dem die Formyl-Gruppe durch eine alkylierende Einheit (Abbildung 7) substituiert ist, ist ein stark cytotoxischer Wirkstoff, der ein breites Spektrum an anti-tumor Aktivitäten aufweist.⁶¹ In Analogie zum Distamycin zeigt dieses Derivat eine Präferenz für AT-Basenpaare. Der Austausch eines oder mehrerer *N*-Methylpyrrole gegen den Pyrazol-Baustein **8** (siehe Abbildung 3) liefert Verbindungen, die eine starke Affinität mit GC-reichen Sequenzen zeigen sollten. Die Leitstruktur **18** beispielsweise, die einen Pyrazol-Baustein enthält, besitzt, verglichen mit dem Tallimustin, die gleiche Aktivität gegenüber L1210-Zelllinien, aber eine geringere *in-vivo* Toxizität.^{54e,62}

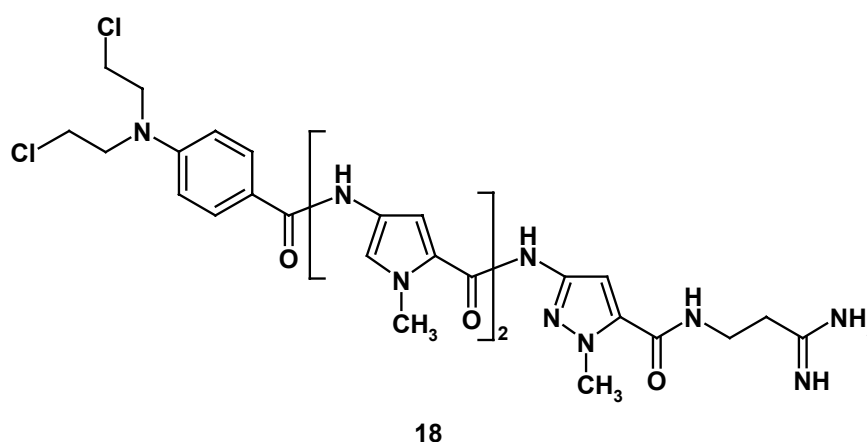


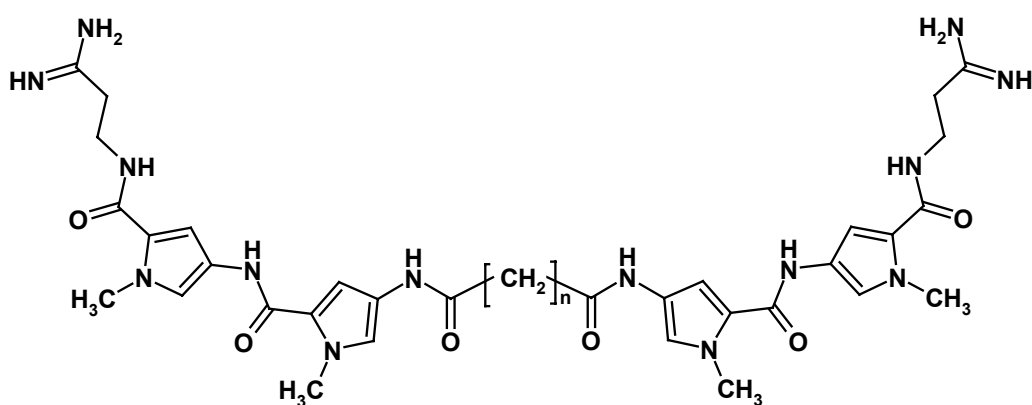
Abb. 7: Strukturformel des Tallimustin-Analogons **18**.

Die Verwendung eines Triazol-Bausteins **11** (siehe Abbildung 3) in Carboxamiden wird in der Literatur nur einmal beschrieben.⁶³ Die hierbei dargestellten Analoga des Netropsins (Austausch eines Pyrrolrings sowie beider Pyrrolringe gegen ein 1,2,4-Triazol) bzw. Distamycins (Austausch eines Pyrrol-Ringes) zeigen in den durchgeführten Untersuchungen im Vergleich zu den analogen Naturstoffen nur geringe Bindungskonstanten und schwache Affinitäten bezüglich poly(dA)-poly(dT) DNS. Eine erhöhte Präferenz für poly(dG)-poly(dC) Desoxyribonucleinsäuren gegenüber den Imidazol-Derivaten kann ebenso wenig beobachtet werden.

2 Prinzipien der Verknüpfung heteroaromatischer Oligoamide

Um eine einzige Bindungsstelle im menschlichen Genom, welches etwa drei Milliarden Basenpaare besitzt, zu spezifizieren, werden Liganden benötigt, welche 15 bis 16 aufeinanderfolgende Basenpaare binden.^{64,65} Ein erster Ansatz hatte deshalb das Design von Oligoamiden mit vier, fünf und sechs *N*-Methylpyrrolcarboxamiden zum Ziel, um entsprechend sechs, sieben bzw. acht konsekutive AT-Basenpaare binden zu können. Theoretisch gelingt bei einer Verwendung von Derivaten, die *n*-1 fünfgliedrige Carboxamid-Bausteine bzw. *n* Amidbindungen enthalten, die Bindung von *n*+1 aufeinanderfolgenden Basenpaaren.^{64,66} Bindungsstudien haben jedoch gezeigt, dass die Bindungskonstante ihr Maximum bereits bei der Verwendung eines Penta-Amids erreicht.⁶⁷ Dieser Befund kann zum einen damit erklärt werden, dass sich die länger werdende Kette aufgrund der starren Struktur nicht mehr der natürlichen Windung der dDNS anpassen kann,^{67,68} zum anderen ist eine *N*-Methylpyrrolcarboxamid-Einheit etwa 20 % länger, als das entsprechende Basenpaar, an das es bindet.⁶⁹

Um sowohl das Problem der auftretenden Geometrieunterschiede zu lösen als auch eine Erhöhung der Affinität sowie der Spezifität der Liganden an dDNS zu erreichen, wurden dimere, trimere und tetramere Oligoamid-Bausteine miteinander verknüpft. Im Folgenden soll ein Überblick über die entwickelten Verknüpfungsprinzipien gegeben werden.



19 - 28 : $n = 1 - 10$

Abb. 8: Über einen flexiblen Linker Kopf-Kopf verknüpfte Netropsin-Derivate 19-28.

Eine Möglichkeit der kovalenten Verbrückung zweier Netropsin- bzw. Distamycin-Moleküle und deren Derivate besteht in der Verwendung von poly-Methylen Linkern.

Abbildung 8 zeigt die von Lown und Mitarbeitern synthetisierten Bis(netropsin)-Derivate,⁷⁰⁻⁷² deren Monomere über CH₂-Spacer Kopf-Kopf („head-to-head“) verbrückt sind.⁷³ Die Bindungskonstanten der Verbindungen **19-28** mit Kalbs-Thymus dDNS, die mittels des Ethidiumbromid-Verdrängungs-Essays bestimmt wurden,⁴⁷ liegen zwischen 0.9 und $7.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ und damit im Bereich des monomeren Netropsins.⁷⁰ Aus „DNase I Footprinting“-Studien⁷⁴ geht jedoch hervor, dass über poly-Methylen-Linker verbrückte Bis(netropsin)-Derivate bei einer minimalen Spacer-Länge von drei CH₂-Gruppen eine bidentale (Abbildung 9b) Bindung mit dDNS eingehen können. Aufgrund der Flexibilität des Linkers ist jedoch immer auch eine monodentale Bindung (Abbildung 9a) möglich.^{71,72}

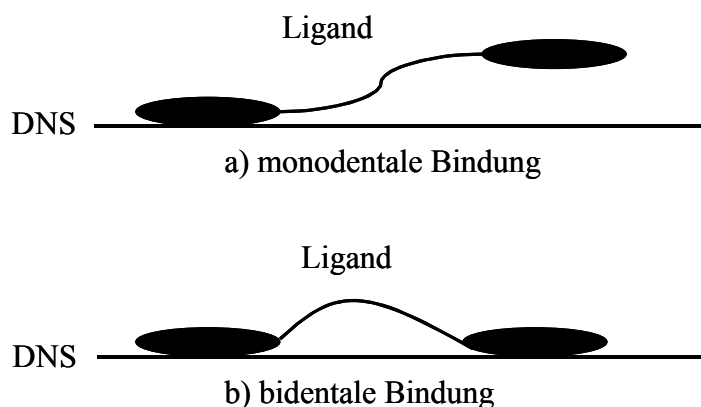


Abb. 9: Schematische Darstellung einer a) monodentalen und einer b) bidentalen Bindung eines Liganden in der kleinen Furche einer doppelhelicalen DNS.

In Analogie zu obigen Kopf-Kopf verbrückten Derivaten können zwei Netropsin-Moleküle unter Verwendung von poly-Methylen Linkern auch Kopf-Schwanz („head-to-tail“) miteinander verknüpft werden. Abbildung 10 zeigt die von Guo und Mitarbeitern synthetisierten Bis(netropsin)-Derivate, deren Monomere über CH₂-Spacer verbrückt sind.^{75,76} Die relativen Bindungskonstanten dieser Liganden an poly(dA)-poly(dT) DNS, die mittels des Ethidiumbromid-Verdrängungs-Essays bestimmt wurden, liegen zwischen 0.55 und $1.67 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.^{47,75}

Im Gegensatz zu oben beschriebenen Derivaten sind diese Monomere Schwanz-Schwanz („tail-to-tail“) verknüpft. Die sowohl für die Bindung von doppelsträngiger DNS als auch für die Wasserlöslichkeit der dargestellten Verbindungen nötige positive Ladung ist bei diesem Ansatz im verwendeten Spacer lokalisiert, der unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegt.

Die Verbindungen **36**, **37** und **38** zeigen im Vergleich zu äquivalenten monomeren Derivaten eine signifikant höhere Affinität zu poly[(dAT)]-poly[(dAT)] DNS. Der größte Anstieg der Bindungskonstante (33-fach, bezogen auf ein analoges Monomer) wird bei dem Bis(lexitropsin) **36** beobachtet.⁷⁹ Bei der Bindung an die dDNS überlappt jeder der beiden „Arme“ eines Dimers in einer antiparallelen Weise mit je einem entsprechenden „Arm“ zweier gegenüberliegender Moleküle. Bei dieser Form der Bindung werden 8 bis 10 aufeinanderfolgende AT-Basenpaare gebunden.

Im Gegensatz zu diesen flexiblen Bis(lexitropsinen) binden Netropsin-Derivate, die über einen starren Linker miteinander verknüpft (Abbildung 12)⁸⁰ sind, an Sequenzen mit 8 bis 10 aufeinanderfolgenden Basenpaaren. Hierbei wird die unerwünschte Monomer-Bindung an kürzere Sequenzen nicht beobachtet.^{72,81}

Bei den *cis*- bzw. *trans*-cyclopropyl verbrückten Netropsin-Analoga **41** bzw. **42** zeigen sich jedoch Unterschiede in den Bindungseigenschaften.^{81,82} Diese Bis(netropsin)-Derivate interagieren mit einer geeigneten dDNS in einem Zwei-Stufen-Mechanismus, der von der Salzkonzentration des jeweiligen Liganden abhängt.

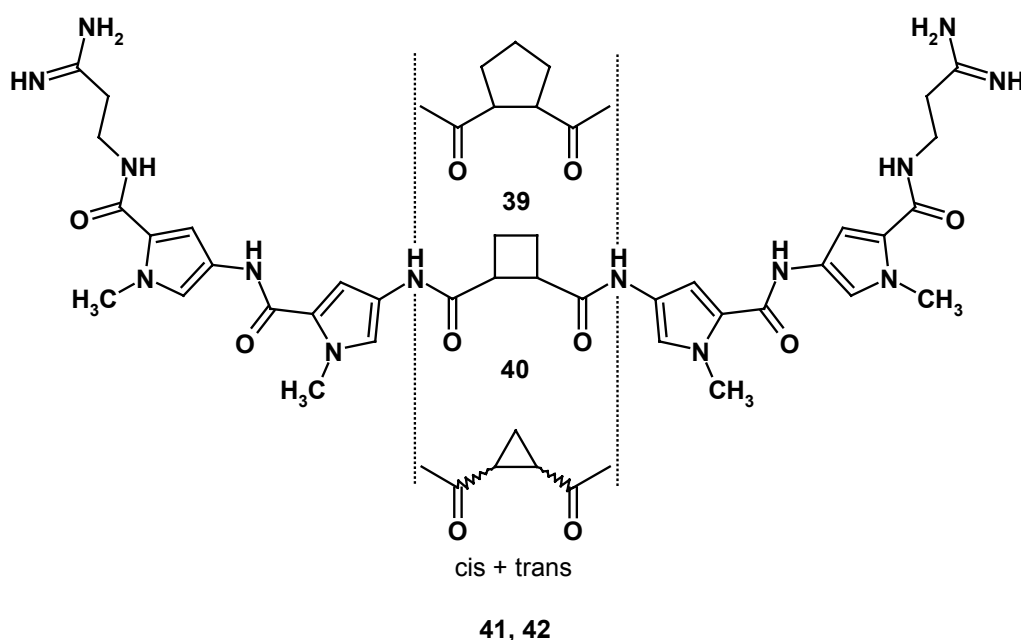


Abb. 12: Beispiele für die Bis(netropsin)-Derivate **39-42**, deren Monomere über starre Linker verknüpft sind.

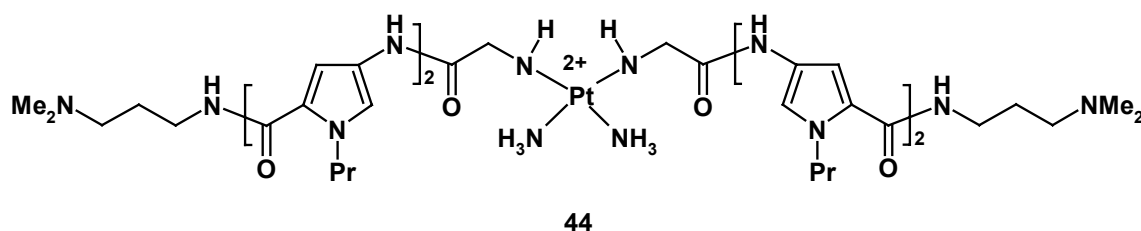


Abb. 14: Über eine *cis*-Diammin-Platin(II)-Einheit miteinander verknüpfte Netropsin-Analoga (Pr: Propyl-Rest).

Das Bis(netropsin)-Analogon **44** bildet mit poly[(dAT)]-poly[(dAT)] DNS und Desoxyribonucleinsäure-Oligomeren der Sequenz 5'-CC(TA)_nCC-3' mit $n = 4, 5, 6$ zwei Arten von Komplexen aus.^{88,91} Im ersten Typ bindet der Ligand in seiner gestreckten Konformation beispielsweise 8 bis 9 aufeinanderfolgende AT-Basenpaare einer poly[(dAT)]-poly[(dAT)] DNS. Im Gegensatz dazu weist der zweite Komplex eine Hairpinstruktur auf,⁹² in der die beiden Netropsin-verwandten Einheiten in einer zueinander parallelen Anordnung in die kleine Furche insertieren. Die Umwandlung der beiden Komplexe ineinander erfolgt „*molecular modeling*“ Studien zufolge durch Rotation um die $N-C^\alpha$ und $C^\alpha-C'$ Einfachbindungen in einem der beiden Glycin Reste, die an den Platin(II)-Linker gebunden sind.

In dem parallelen „side-by-side“ Bindungsmotiv des Hairpins liegen die Pyrrol-Ringe der beiden „Arme“, anders als bei der antiparallelen side-by-side Anordnung⁹² direkt übereinander. Sie besetzen dabei nichtäquivalente Positionen in der kleinen Furche. Das eine Fragment bildet stärkere Kontakte mit den Basenpaaren aus, wohingegen das zweite Fragment weniger starke Interaktionen zeigt.^{88,91}

Ferner besitzt Verbindung **44** die Eigenschaft, Desoxyribonucleinsäure sequenzspezifisch zu spalten.⁸⁶ Nach Einwirken von Röntgenstrahlung auf einen Platin(II)-Bis(netropsin)-dDNS Komplex, kann eine selektive Spaltung an den vom Liganden **44** bevorzugt gebundenen Stellen beobachtet werden. Hierbei wird jeder der beiden DNS-Stränge pro Bindungsstelle nur einmal geschnitten.

Das 1989/90 gefundene 2:1 Ligand/dDNS-Bindungsmotiv, bei dem sich zwei Distamycine in einer „side-by-side“ Anordnung antiparallel in die kleine Furche einer DNS-Doppelhelix einlagern,^{21,22} führte zur Entwicklung neuer Klassen von dDNS-bindenden Liganden. Durch die Kopf-Schwanz Verknüpfung der einzelnen Polyamid-Untereinheiten über eine flexible Aminosäure gelang es, die auftretenden Geometrieunterschiede zwischen dem Liganden und den Basenpaaren der dDNS

auszugleichen und gleichzeitig die Spezifität sowie die Affinität zu erhöhen. Als idealer Linker hat sich dabei das β -Alanin (β) erwiesen.^{93,94} Eine Anordnung, bei der sich zwei dieser Aminosäuren gegenüberliegen, zeigt zudem eine 20-fach höhere Spezifität für AT- bzw. TA- im Vergleich zu GC- bzw. CG-Basenpaaren.^{95,96,93} Mittels dieser Strategie gelang es, eine Sequenz von 11 aufeinanderfolgenden Basenpaaren einer doppelhelicalen DNS zu erkennen (Abbildung 15a).

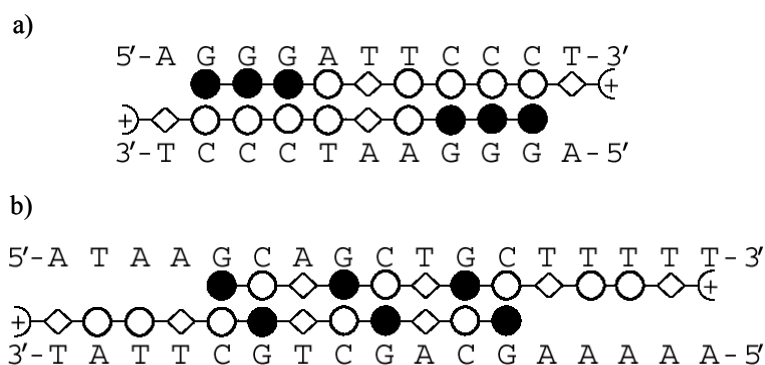


Abb. 15: Schematische Darstellung gestreckter Polyamide an deren jeweiliger Bindungsstelle in der kleinen Furche einer doppelhelicalen DNS [Die schwarzen bzw. weißen Kreise symbolisieren Imidazol bzw. Pyrrol, die Diamanten symbolisieren β -Alanin, +) steht für den unter physiologischen Bedingungen protonierten *N,N*-Dimethylaminopropylamin-Rest]. a) vollständig überlappendes Homodimer, welches 11 Basenpaare erkennt, b) teilweise überlappendes Homodimer, welches 16 Basenpaare erkennt.

Wie NMR-Studien gezeigt haben, lagern sich hierbei zwei Achtring-Polyamide derart antiparallel in die kleine Furche der dDNS ein, dass sich die einzelnen Amidstränge vollständig überlappen.⁹³

Die sequenzspezifische Bindung an 16 aufeinanderfolgende Basenpaare in der kleinen Furche einer doppelhelicalen DNS wurde erstmals 1998 von der Arbeitsgruppe um *Dervan* beschrieben.⁹⁴ Die Erkennung, mit einer Assoziationskonstanten $K_a \geq 3.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, gelingt hierbei ebenfalls mittels eines Achtring-Polyamids aus *N*-Methylpyrrol, *N*-Methylimidazol und β -Alanin, das ein teilweise überlappendes Homo-Dimer ausbildet (Abbildung 15b).

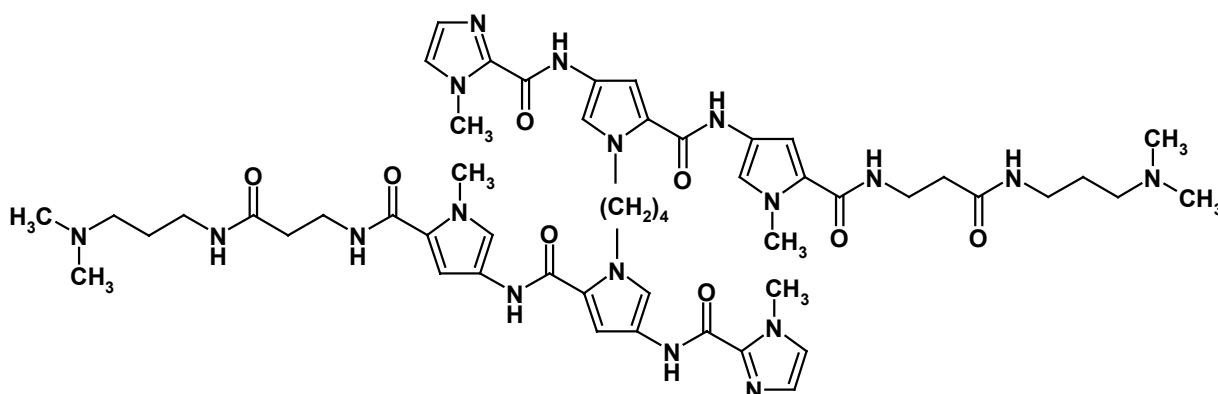
Obgleich diese 2:1 Ligand/dDNS-Bindung auf kooperative Art und Weise erfolgt, ist die Assoziation zweier Liganden mit einer Ziel-dDNS entropisch weniger begünstigt, als die Bindung eines einzelnen Substrates.

CN(C)CCNC(=O)c1cc(NC(=O)c2cc(NC(=O)c3cc(NC(=O)CCN(C)C)c3)c2)c1

Abb. 16: Über Methylen-Linker kreuzverbrückte Lexitropsine.

Einen schnellen Zugang zu kreuzverbrückten Polyamiden ermöglicht ein 1998 entwickeltes Festphasenprotokoll.⁹⁸ Das hierbei synthetisierte Oligocarboxamid **55** (Abbildung 17) bindet an eine geeignete Doppelstrang-DNS mit einer ca. 180-fachen

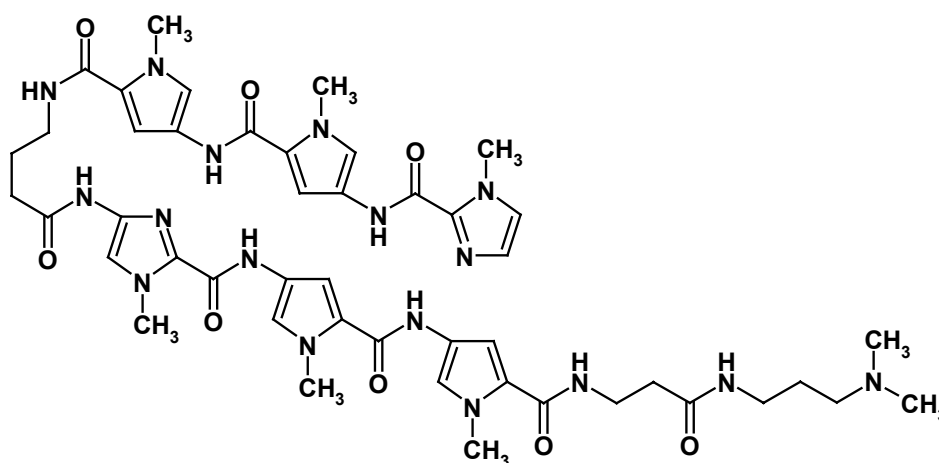
Affinität sowie einer 10-fachen Spezifität verglichen mit dem analogen nicht-verbrückten Monomer.



55

Abb. 17: Beispiel für einen *N*-Methylpyrrol-*N*-Methylimidazol H-Pin.

Der Durchbruch im rationellen Design von Liganden, welche in der kleinen Furche einer doppelhelicalen DNS binden, gelang durch die Synthese von Oligoamiden mit Hairpinstruktur.¹¹⁰ Diese Liganden binden Desoxyribonucleinsäuren mit Affinitäten und Spezifitäten, die in der Größenordnung von natürlichen dDNS-bindenden Proteinen liegen.^{33,34,111-114} Als optimaler Linker für die Verknüpfung der beiden Amidstränge hat sich die γ -Aminobuttersäure (γ) erwiesen (Abbildung 18).¹¹⁰



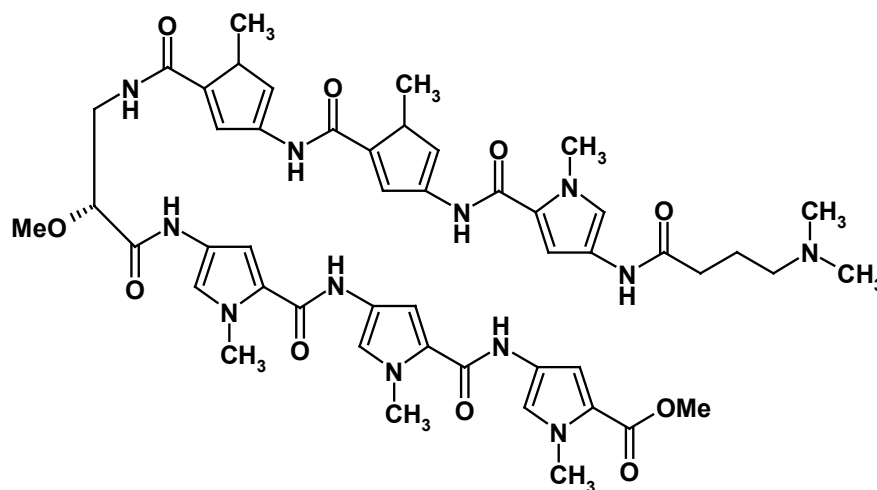
56

Abb. 18: ImPyPy- γ -ImPyPy- β -Dp (56) als Beispiel für Oligoamide mit Hairpinstruktur.

Bei der Verwendung von Spacern mit nur einer (Glycin) bzw. zwei Methylen-Einheiten (β -Alanin) wurde keine bzw. nur eine geringe Affinität mit der Ziel-dDNS erreicht.

Auch bei dem Linker mit vier Methylen-Gruppen zeigte sich gegenüber dem γ -Aminobuttersäure-Spacer (drei CH_2 -Einheiten) eine geringere Affinität. Letzterer Befund wird dadurch erklärt, dass der Linker zwar einen „turn“ induziert, der Hairpin sich aber durch die zusätzliche CH_2 -Gruppe nicht mehr optimal in die kleine Furche einlagern kann.¹¹⁵

Eine Alternative zu dem γ -Linker wurde von *Boger* und Mitarbeitern vorgestellt (Abbildung 19).¹¹⁶ Der von Ihnen verwendete (*R*)- α -Methoxy- β -Alanin-Spacer, welcher in einem Sechsring-Carboxamid zwei PyPyPy-Bausteine miteinander verknüpft, induziert, im Gegensatz zum unsubstituierten β -Alanin, ebenfalls eine Haarnadel-Struktur.



57

Abb. 19: (*R*)- α -Methoxy- β -Alanin verbrücktes Oligoamid **57**.

Wird in einer Hairpinstruktur eines Oligoamides das *N*-Methylimidazol eines Im/Py-Paares gegen das 3-Pyrazol **58** (Abbildung 20) ausgetauscht, erhöht sich sowohl die Affinität als auch die Spezifität für ein Guanin-Cytosin-Basenpaar. Letztere resultiert dabei infolge der Ausbildung einer spezifischen H-Brücke zwischen der exocyclischen Aminogruppe des Guanins und dem Stickstoff N 2 des 3-Pyrazolringes.

Die Addition eines C-terminalen β -Alanins erhöht sowohl die Spezifität als auch die Affinität der Hairpin-Derivate.¹¹⁷ Ferner weisen die endständige Aminosäure sowie der γ -Turn eine 200-400-fache Präferenz für AT/TA-Basenpaare im Vergleich zu GC-Paaren auf.¹¹⁸

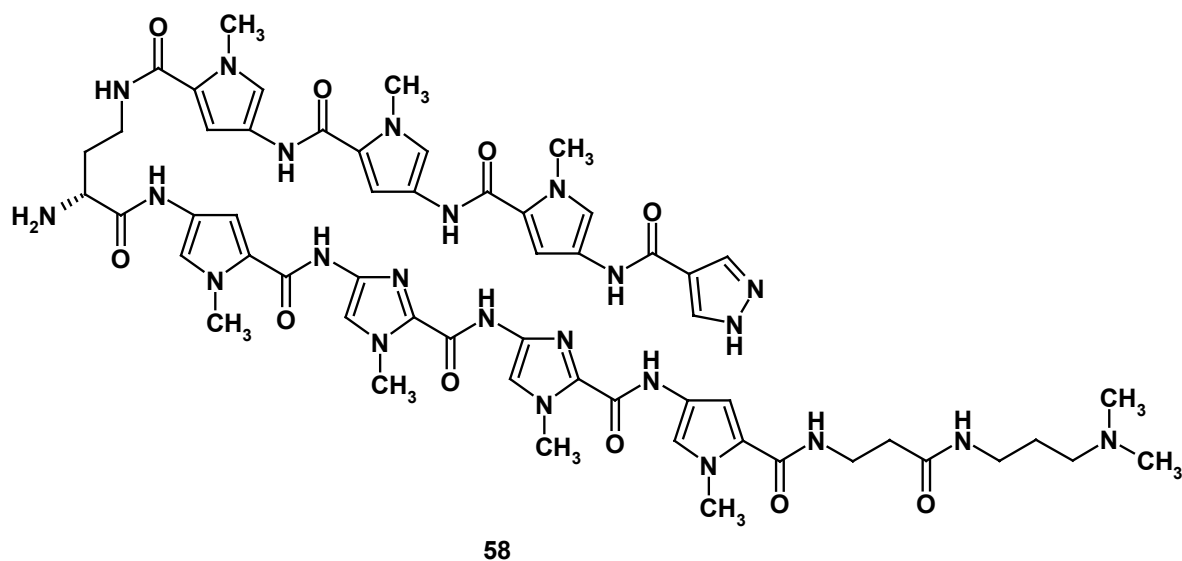


Abb. 20: Strukturformel eines Pyrazolcarboxamid-Hairpins (**58**).

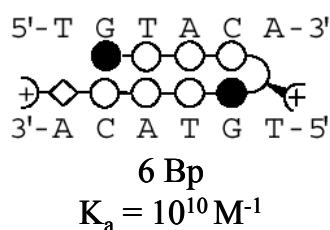
Sowohl die Bindungskonstanten als auch die Affinitäten der Hairpinstrukturen sind im Vergleich zu analogen H-Pin Molekülen deutlich größer. So bindet beispielsweise das in Abbildung 18 dargestellte Derivat **56** an die Sequenz 5'-TGTC A-3' ($K_a = 2.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) mit 20-facher Affinität und einer um den Faktor drei größeren Spezifität als das entsprechende kreuzverknüpfte Lexitropsin **55** (Abbildung 17, $K_a = 9.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$).⁹⁸

Einen schnellen Zugang zu den Hairpin-Derivaten ermöglichen die ebenfalls von der Arbeitsgruppe um *Dervan* entwickelten Festphasenprotokolle, welche sich sowohl der *tert.*-Butyloxycarbonyl (Boc)-¹¹⁹ als auch der Fluorenyl-9-methoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppenstrategie¹²⁰ bedienen.

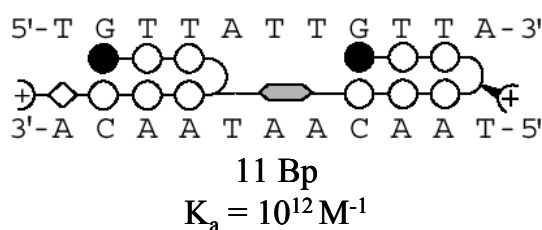
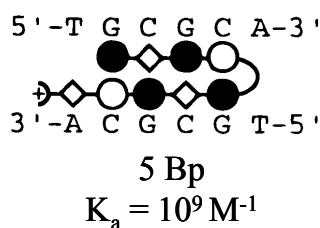
Auf der Grundlage der Hairpinstrukturen sind weitere Bindungsmotive entwickelt worden, die mit hoher Affinität und Spezifität an vorherbestimmte dDNS-Sequenzen binden (Abbildung 21).

Die selektive Einführung einer Amino-Funktion an der prochiralen α -Position des γ -Aminosäure-Linkers erzeugt eine zweite positive Ladung in den Hairpin-Molekülen (Abbildung 21a).^{121,122} Diese Modifikation erhöht die Affinität dieses Liganden an die Ziel-dDNS um den Faktor 10 im Vergleich zum unsubstituierten Analogon, wobei kein Spezifitätsverlust für die gebundenen Basenpaare zu beobachten ist.¹²¹

a) Hairpin mit chiralem Linker



b) Tandem-Hairpin


 c) Hairpin mit β -Alanin/Heterocyclen-Paar


d) Cyclus

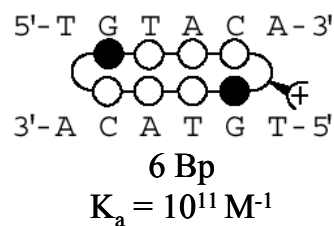


Abb. 21: Neue Polymid-dDNS Bindungsmotive [K_a : Gleichgewichts-Assoziations-Konstante, Bp: Basenpaare; die schwarzen bzw. weißen Kreise symbolisieren Imidazol bzw. Pyrrol, die Diamanten symbolisieren β -Alanin, +) steht für den unter physiologischen Bedingungen protonierten *N,N*-Dimethylaminopropylamin-Rest, in a), b) und d) symbolisiert die Kurvenlinie (*R*)-2,4-Diaminobuttersäure, in c) die γ -Aminobuttersäure].

Die Größe der Bindungsstelle kann durch kooperative Aneinanderlagerung zweier chiraler Sechsring Hairpins auf 10 Basenpaare erhöht werden, ohne das Molekulargewicht des Liganden zu vergrößern (Abbildung 22).¹²² Sowohl die Bindungsaffinität als auch die Spezifität sind vergleichbar mit denen von „normalen“ Sechsring-Hairpins, welche fünf Basenpaare erkennen.^{110,115,123,124}

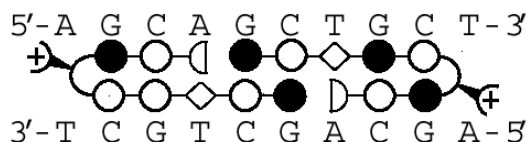


Abb. 22: Schematische Darstellung eines kooperativ bindenden chiralen Hairpins [Die Halbkreise symbolisieren die $(\text{CH}_2)_2\text{-OH}$ -Gruppe; zur weiteren Legende siehe Abbildung 21].

Des Weiteren können zwei der chiralen Haarnadel-Liganden, beispielsweise durch die Reaktion mit 5-Amino-Valeriansäure, über die eingeführte NH_2 -Gruppe kovalent miteinander verbunden werden. Dieses Bindungsmotiv wurde in dem sogenannten

Tandem-Hairpin verwirklicht (Abbildung 21b).¹²⁵ Die Arbeitsgruppe um *Dervan* konnte zeigen, dass durch diese Verknüpfung sowohl die Größe der Bindungsstelle als auch die Affinität des dDNS-bindenden Liganden signifikant zunimmt. Der abgebildete Sechsring/Sechsring-Hairpin bindet bei einer Konzentration im picomolaren Bereich an die Sequenz 5'-TGTTATTGTTA-3' mit mindestens 4500-facher Spezifität gegenüber 5'-TGTCATTGTCA-3' (die „nicht-gewünschten“ Basenpaare in der betrachteten Sequenz sind unterstrichen).¹²⁵

Neben diesen Tandem-Hairpins, die über den Linker des einen Monomers mit dem Schwanz des anderen Monomers kovalent verbunden sind, wurden auch Linker-Linker verbrückte Derivate synthetisiert.¹²⁶ Die dargestellten Sechsring/Sechsring-Tandemstrukturen erreichen allerdings „nur“ Gleichgewichts-Assoziations-Konstanten von maximal $7.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ bei einer Bindungsstelle von 10 aufeinanderfolgenden Basenpaaren.

Da die Mikrostruktur von doppelhelicaler DNS sequenzabhängig ist,¹²⁷⁻¹³⁰ sind bestimmte Sequenzen schwer zu erkennen.¹²⁴ So zeigt beispielsweise das Achtring-Polyamid ImPyImPy- γ -ImPyImPy- β -Dp, welches synthetisiert wurde, um an die Sequenz 5'-TGCGCA-3' zu binden, nur eine mäßige Affinität ($K_a = 3.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) mit dieser Basenpaarabfolge.¹³¹ Der selektive Ersatz eines *N*-Methyl-Imidazols oder eines *N*-Methyl-Pyrrols durch die aliphatische Aminosäure β -Alanin kann die Struktureffekte, die bei dieser dDNS-Sequenz auftreten, ausgleichen (Abbildung 21c). Das synthetisierte Derivat Im- β -ImPy- γ -Im- β -ImPy- β -Dp, welches das Im/ β -Paar enthält bindet obige Sequenz im subnanomolaren Bereich ($K_a = 3.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$).¹³¹

Cyclische Polyamide binden dDNS mit höherer Affinität als die entsprechenden Hairpin-Analoga.¹³²⁻¹³⁴ So zeigt beispielsweise der in Abbildung 21d dargestellte Cyclus mit $K_a = 7.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ eine, gegenüber dem entsprechenden Haarnadel-Derivat, um den Faktor acht höhere Gleichgewichts-Assoziations-Konstante bezüglich der Zielsequenz 5'-AGTACT-3'. Der Cyclus weist dabei eine Sequenzspezifität auf, die in der Größenordnung der entsprechenden Hairpinstruktur liegt.¹³³

3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die in der letzten Dekade veröffentlichten Ergebnisse haben gezeigt, dass mittels heteroaromatischer Oligoamide eine spezifische Erkennung spezieller dDNS-Sequenzen in der kleinen Furche einer doppelhelicalen DNS möglich ist. Wenngleich das Zusammenspiel von Faktoren, welche die Affinität und die Sequenzspezifität steuern, noch nicht vollständig verstanden ist, so ist es doch gelungen Liganden zu synthetisieren, die in vielen Fällen mit der Proteinbindung interferieren können. Im Gegensatz zu den Naturstoffen Netropsin und Distamycin scheinen diese Pyrrol/Imidazol-Polyamide nicht giftig zu sein.^{24d,36} Der momentane Focus der Molekularen Medizin richtet sich daher auf die Entwicklung neuer Strategien zur Regelung der Genexpression in lebenden Zellen mittels dieser Oligocarboxamide.³⁶⁻⁴²

B Hauptteil

1 Immobilisierte Oligoamide mit sequenzspezifischer dDNS-Affinität

1.1 Heteroaromatische Oligoamide als Affinitätsliganden für eine chromatographische Trennung von dDNS¹

1.1.1 Einführung

Die Affinitätschromatographie bezeichnet eine spezielle Methode der Chromatographie, die in der Biochemie beispielsweise zur Isolierung oder Anreicherung von speziellen Proteinen oder Nukleinsäuren aus komplexen biologischen Systemen benutzt wird.¹³⁵ Das Prinzip beruht auf der selektiven und reversiblen Bindung von Makromolekülen an Liganden, die auf einer stationären Träger-Matrix immobilisiert sind. Durch spezifische Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen werden aus einem Gemisch selektiv nur vorherbestimmte Substanzen adsorbiert. Die anschließende Elution der gebundenen Komponenten kann durch die Änderung des pH-Wertes, der Ionenstärke oder biospezifisch mit einem kompetitiven, löslichen Inhibitor oder Ligand-Analagon erfolgen.¹³⁵

Erste Untersuchungen belegen, dass heteroaromatische Oligoamide zur Aufreinigung von dDNS-Fragmenten bzw. Abreicherung von dDNS aus biologischen Präparaten eingesetzt werden können.¹³⁶ Im Folgenden wird ein eingehenderes Studium dieser Eigenschaften anhand eines tetrameren *N*-Methylpyrrol-Oligoamids, welches über eine endständige Glycin-Einheit auf einem polymeren Träger fixiert werden kann, angestrebt.

Um die Synthese im Hinblick auf den Einsatz weiterer Bausteine möglichst flexibel zu gestalten bzw. um längere Sequenzen synthetisieren zu können, soll die Darstellung an der festen Phase erfolgen. Ziel ist es, das von der Arbeitsgruppe um *Dervan* entwickelte Festphasenprotokoll¹³⁷ auf den Peptidsyntheseautomaten „Modell 90“ der Firma Advanced ChemTech zu übertragen bzw. geeignet zu modifizieren. Des Weiteren soll ein HPLC-Protokoll, sowohl für eine analytische Kontrolle der einzelnen

¹ Das Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Merck KGaA, Darmstadt durchgeführt.

Kupplungsschritte bzw. des Produktes als auch für eine semipräparative Aufreinigung des Rohproduktes etabliert werden.

Die Bindungseigenschaften des polymergebundenen Affinitätsliganden mit Plasmid-dDNS sollen abschließend mittels eines UV-Assays untersucht werden.

1.1.2 Monomer-Synthese

Da die Synthese des verwendeten Bausteins Boc-Py-OBt **65** (Abbildung 23) literaturbekannt ist,¹³⁷ soll im Folgenden nur kurz darauf eingegangen werden.¹³⁸

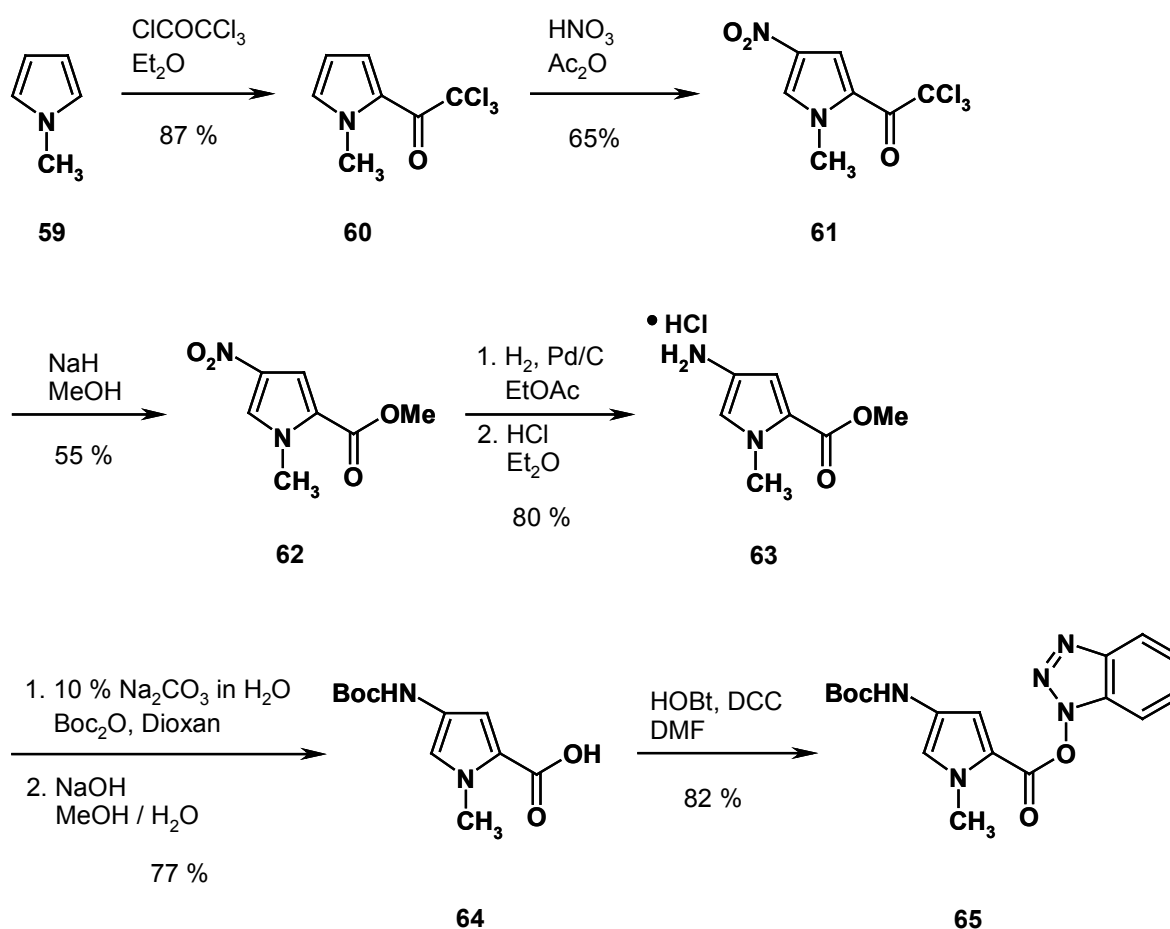


Abb. 23: Synthese des Monomer-Bausteins Boc-Py-OBt (**65**).

Ausgehend von *N*-Methylpyrrol **59** wird Verbindung **60** durch Umsetzung mit Trichloroacetylchlorid in Diethylether erhalten. Anschließende Nitrierung mit HNO_3 in Essigsäureanhydrid liefert das Derivat **61**, das durch Behandeln mit NaH in Methanol zum entsprechenden Methylester **62** reagiert. Durch die Reduktion der Nitroverbindung mittels Wasserstoff und Pd/C in EtOAc wird ein instabiles Amin erhalten, das *in situ*

zum entsprechenden Hydrochlorid-Salz **63** umgesetzt wird. Die Einführung der Boc-Schutzgruppe in Form des Anhydrids und anschließende Hydrolyse des Methylesters liefert die freie Carbonsäure **64**. Die Darstellung des gewünschten Benzotriazol-Aktivesters Boc-Py-OBt (**65**) gelingt schließlich durch eine Peptidkupplung mit DCC und HOBt in Dimethylformamid.

1.1.3 Synthese am polymeren Träger

1.1.3.1 Einführung

Die Synthese von Peptiden in Lösung, d.h. in homogener Phase, ist neben den oft auftretenden Löslichkeitsproblemen bei länger werdenden Aminosäure-Sequenzen durch einen hohen Arbeitsaufwand gekennzeichnet. Eine erhebliche Erleichterung ergibt sich durch die 1963 von *R. B. Merrifield* entwickelte Peptid-Festphasensynthese an polymeren Trägern.¹³⁹ Der Grundgedanke dieser Strategie besteht darin, eine Aminosäure mit ihrer Carboxylgruppe an ein unlösliches, filtrierbares Polymer zu knüpfen, und dann vom C-Terminus her die Peptidkette schrittweise aufzubauen. In Abbildung 24 ist der Ablauf dieser Festphasen-Peptidsynthese schematisch dargestellt. Im ersten Schritt (Abbildung 24, Schritt I) wird das Harz mittels einer geeigneten Ankergruppierung substituiert. Als polymerer Träger hat sich ein Copolymersiat aus Polystyrol und 1-2 % Divinylbenzol als besonders günstig erwiesen. Die durch Perlpolymerisation erhaltenen Harzkügelchen haben im trockenen Zustand einen Durchmesser von 20-80 μm . In den für die Peptidsynthese verwendeten Lösungsmitteln wie CH_2Cl_2 , DMF oder *N*-Methylpyrrolidon (NMP) quellen sie bis zum Sechsfachen ihres ursprünglichen Volumens auf. Die Reaktionen vollziehen sich somit nicht an einer statischen Trägermatrix, sondern innerhalb eines gut solvatisierten Gels, das bewegliche, für die Reagentien zugängliche Ketten enthält.

Die Anknüpfung der ersten Aminosäure kann über Ester-, Amid- oder Hydrazidbindungen erfolgen, wobei bevorzugt Esterverknüpfungen zum Einsatz kommen (Abbildung 24, Schritt II).

Der sich wiederholende Deblockierungs/Kupplungs-Cyclus wird durch die selektive Abspaltung der N^α -Aminoschutzgruppe eingeleitet (Abbildung 24, Schritt III). Unter den mehr als 130 entwickelten Schutzgruppen für die α -Amino-Funktion¹⁴⁰ finden die acidolytisch abspaltbare Boc-Gruppe¹⁴¹ sowie die, mittels verdünnter Piperidinlösungen entfernbare, Fmoc-Gruppe¹⁴² bevorzugt Anwendung.

In dem sich anschließenden Kupplungsschritt wird die freie Amin-Funktion mit einer weiteren N^α -geschützten Aminosäure umgesetzt (Abbildung 24, Schritt IV). Als Kupplungsstrategien werden hierbei meist Carbodiimid- sowie Aktivestermethoden angewandt.¹⁴³

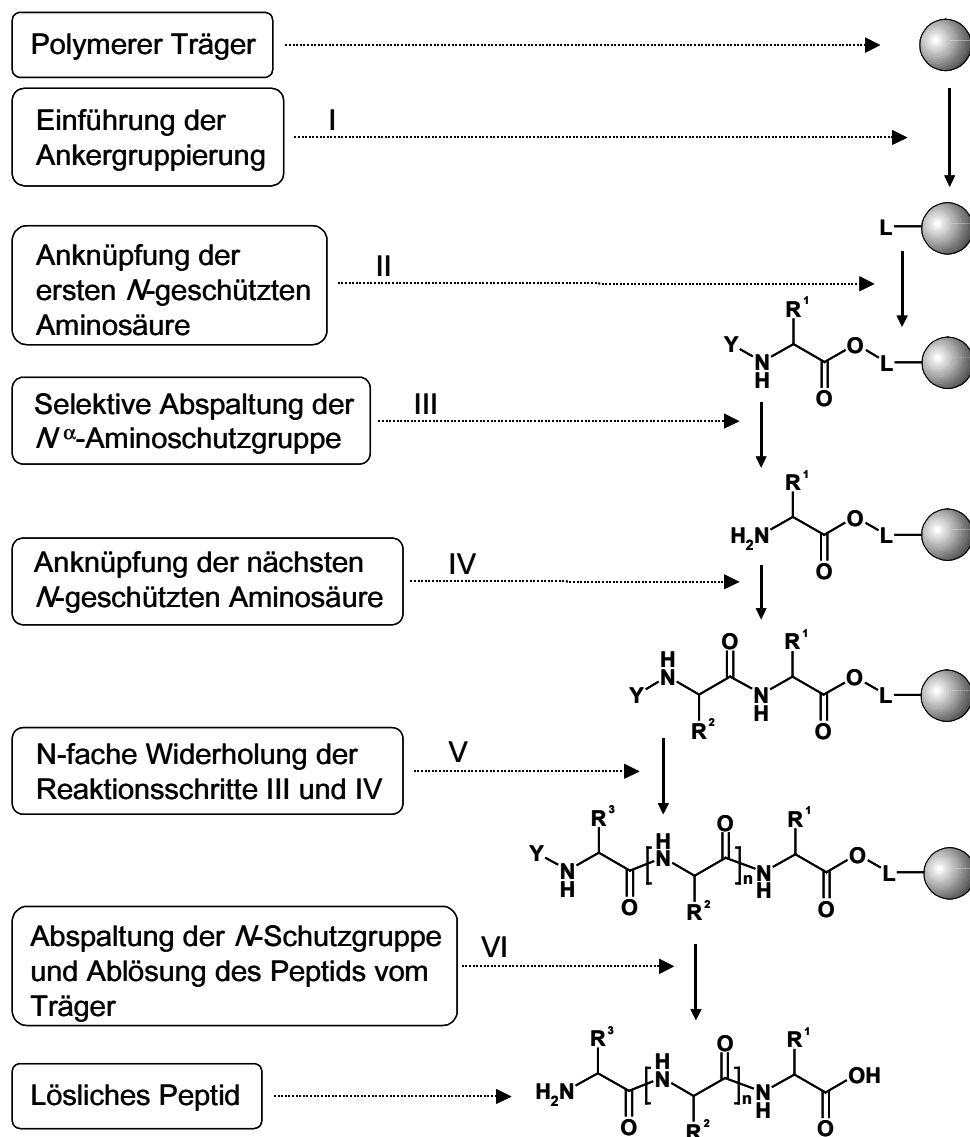
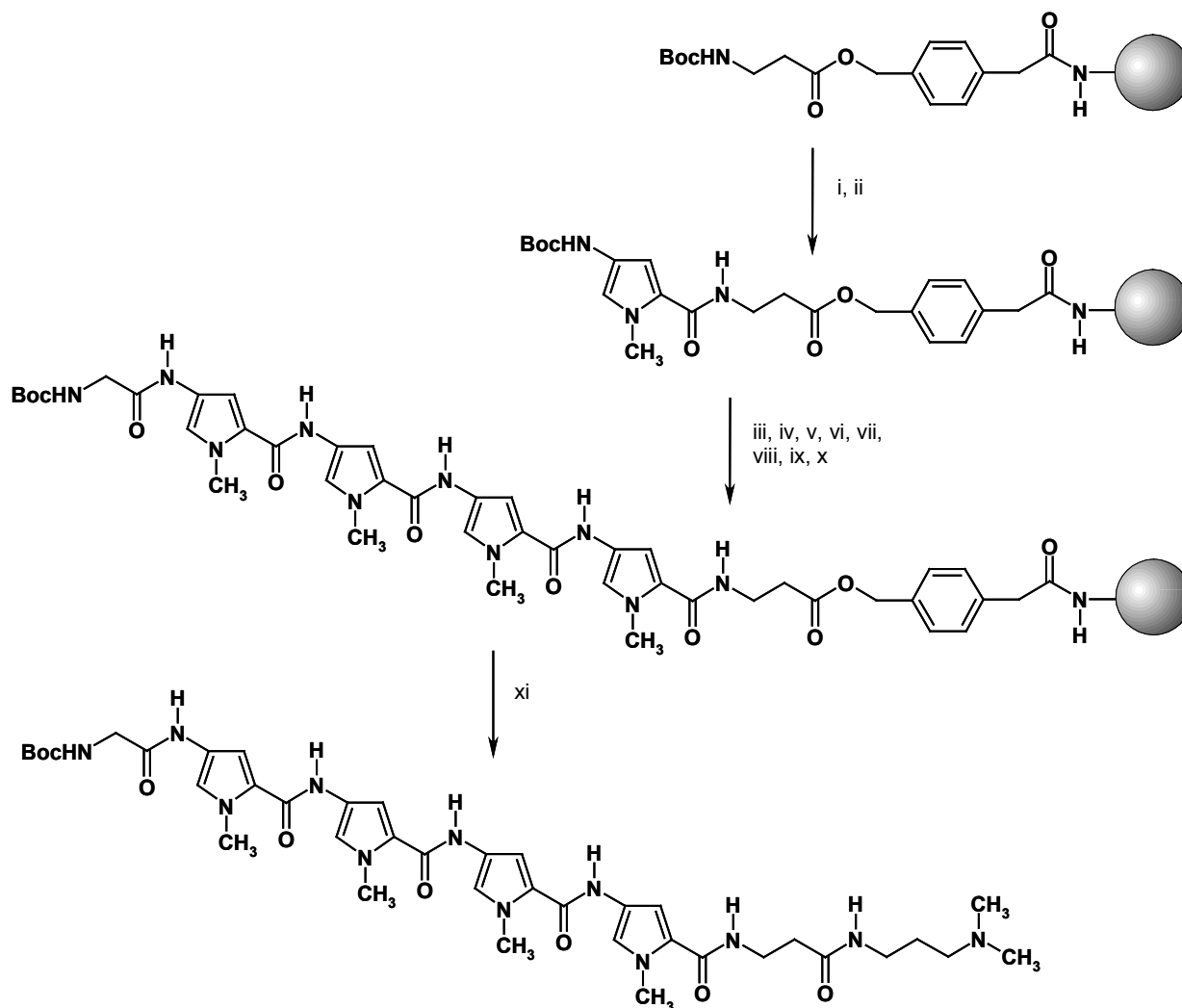


Abb. 24: Schematischer Verlauf der Peptid-Festphasensynthese nach *Merrifield* (L = Linker bzw. Anker, Y = N^α -Aminoschutzgruppe).

Auf der letzten Stufe der Festphasensynthese wird das synthetisierte Peptid vom Polymerharz abgespalten (Abbildung 24, Schritt VI). Der unlösliche Träger kann anschließend durch Filtration von dem nun in Lösung vorliegenden Peptid abgetrennt werden. Die Aufreinigung des Rohproduktes gelingt meist durch „Reversed-Phase (RP)“ HPLC.

1.1.3.2 Festphasensynthese

Die Festphasensynthese des Liganden für die nachfolgende Affinitätschromatographie ist in Abbildung 25 dargestellt.



66

Abb. 25: Schema der Festphasensynthese von Boc-Gly-(Py)₄-β-Dp (**66**) ausgehend von Boc-β-Pam-Harz: (i) 80 % TFA/CH₂Cl₂, 0.4 M PhOCH₃; (ii) Boc-Py-OBt, DIEA, DMF; (iii) 80 % TFA/CH₂Cl₂, 0.4 M PhOCH₃; (iv) Boc-Py-OBt, DIEA, DMF; (v) 80 % TFA/CH₂Cl₂, 0.4 M PhOCH₃; (vi) Boc-Py-OBt, DIEA, DMF; (vii) 80 % TFA/CH₂Cl₂, 0.4 M PhOCH₃; (viii) Boc-Py-OBt, DIEA, DMF; (ix) 80 % TFA/CH₂Cl₂, 0.4 M PhOCH₃; (x) Boc-Gly-OH, HBTU, DIEA; (xi) (*N,N*)-Dimethylaminopropylamin (Dp), 55 °C.

Als polymerer Träger kommt ein mit Boc-β-Alanin funktionalisiertes Pam-Harz (Korngröße 100-200 mesh) zum Einsatz, das einen Belegungsgrad von etwa 0.2 mmol/g

Harz aufweist.¹⁴⁴ Alle Schritte der Festphasensynthese werden in dem Syntheseautomaten „Model 90“ der Firma Advanced ChemTech durchgeführt, wobei das Protokoll so geschrieben wird, dass sowohl die Lösungen der Monomere bzw. der Kupplungsreagenzien als auch die Base automatisch von den entsprechenden Vorratsgefäßen in das Reaktionsgefäß überführt werden.

Im ersten Schritt der automatisierten Synthese werden die Schutzgruppen am Harz mittels 80 % TFA/CH₂Cl₂ unter Zusatz von 0.4 M Anisol (PhOCH₃) abgespalten. Letzteres dient als Abfang-Reagenz („Scavanger“) für das bei der Entschützung entstehende Trityl-Kation.¹⁴⁵ Um ein vollständiges Entfernen der Boc-Gruppen zu gewährleisten wird dieser Vorgang, nachdem das Reaktionsgefäß evakuiert und das Harz mit CH₂Cl₂ gewaschen wurde, wiederholt. Die nachfolgende Anknüpfung des ersten *N*-Methylpyrrol-Bausteins gelingt innerhalb von 180 Minuten.

Der Grad der Erstbelegung des Harzes wird gravimetrisch nach der im Experimentellen Teil (Kapitel D) angegebenen Formel bestimmt.²⁸⁰ Es errechnet sich eine Beladung von 0.19 mmol/g Harz.

Die, nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe, durchgeführte direkte Verknüpfung zweier heterocyclischer Aminosäuren nimmt 240 Minuten in Anspruch. Nach den in der Literatur angegebenen 180 Minuten konnte keine vollständige Belegung des Harzes erreicht werden.¹³⁷

Die Reaktionskontrolle der einzelnen Kupplungsschritte erfolgt mittels analytischer HPLC bzw. HPLC-MS Kopplung, da die freie Amin-Funktion eines nicht umgesetzten heteroaromatischen *N*-Methylpyrrols nicht mittels Farbreaktionen (z.B. Kaiser-Test¹⁴⁶) nachgewiesen werden kann. Dazu wird ein Aliquot des Harzes entnommen (etwa 4 mg) und nach Zugabe von 100 µl (*N,N*)-Dimethylaminopropylamin (Dp) 5 Minuten auf 100 °C erhitzt. Nach Abfiltrieren von der festen Phase werden 5 µl-Proben analysiert.¹⁴⁷ Bei den einzelnen Kupplungsschritten wird eine Kupplungseffizienz von >98 % erreicht.

Die Anknüpfung des endständigen Glycin-Restes gelingt durch eine *in-situ* Aktivierung mit HBTU. Vollständiger Umsatz ist dabei nach einer Kupplungszeit von 120 Minuten zu beobachten.

Die Abspaltung des Oligoamides erfolgt, nach Trocknung im Hochvakuum, in einem Glaskolben. Dazu wird (*N,N*)-Dimethylaminopropylamin zugegeben und 18 h auf 55 °C erwärmt. Nach Abfiltrieren von der festen Phase wird die Reaktionsmischung durch H₂O verdünnt und mittels semipräparativer HPLC gereinigt. Abbildung 26 zeigt

das analytische Chromatogramm des Oligoamids Boc-Gly-(Py)₄-β-Dp (**66**) nach der Trennung.¹⁴⁷ Das Produkt wird in Form eines farblosen Feststoffs in 81 %iger Ausbeute erhalten.

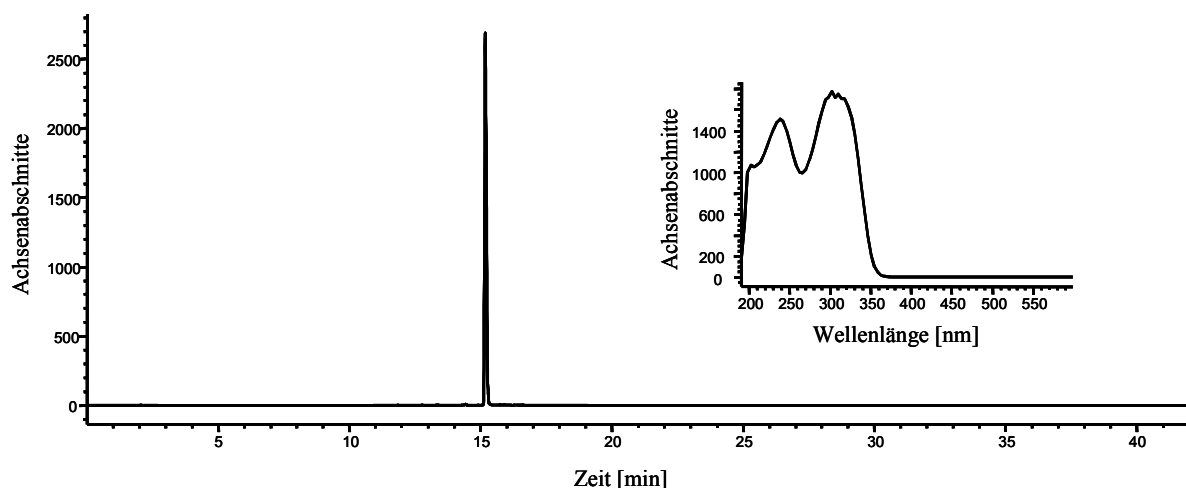


Abb. 26: Analytisches Chromatogramm und zugehöriges UV/VIS-Spektrum des Oligoamides Boc-Gly-(Py)₄-β-Dp (**66**) nach semipräparativer Trennung.

1.1.4 Immobilisierung des Oligoamids auf einem polymeren Träger

Als Träger-Matrix kommt das Fractogel[®] EMD Epoxy zum Einsatz, das eine Anknüpfung des Liganden über reaktive Epoxidgruppen ermöglicht.¹⁴⁸

Um das synthetisierte Peptid auf diesem Polymer zu immobilisieren, muss im ersten Schritt die Boc-Schutzgruppe entfernt werden (Abbildung 27). Die nachfolgende Anknüpfung erfolgt durch Suspendieren des entschützten Peptids sowie des Fractogels in wässrigem Carbonatpuffer (pH 10). Nach viertägigem Rühren bei 40 °C wird das Polymer abgesaugt. Nicht umgesetzte Epoxidgruppen werden durch anschließendes Erwärmen des peptidbeladenen Harzes (2h, 40 °C) in Tris/HCl-Puffer (pH 8), der 0.2 mol/l Glycin enthält, deaktiviert.

Die Belegung des Polymers lässt sich aus der Elementaranalyse von **67** berechnen. Es ergibt sich eine Beladung von 0.26 mmol Peptid/g Harz.

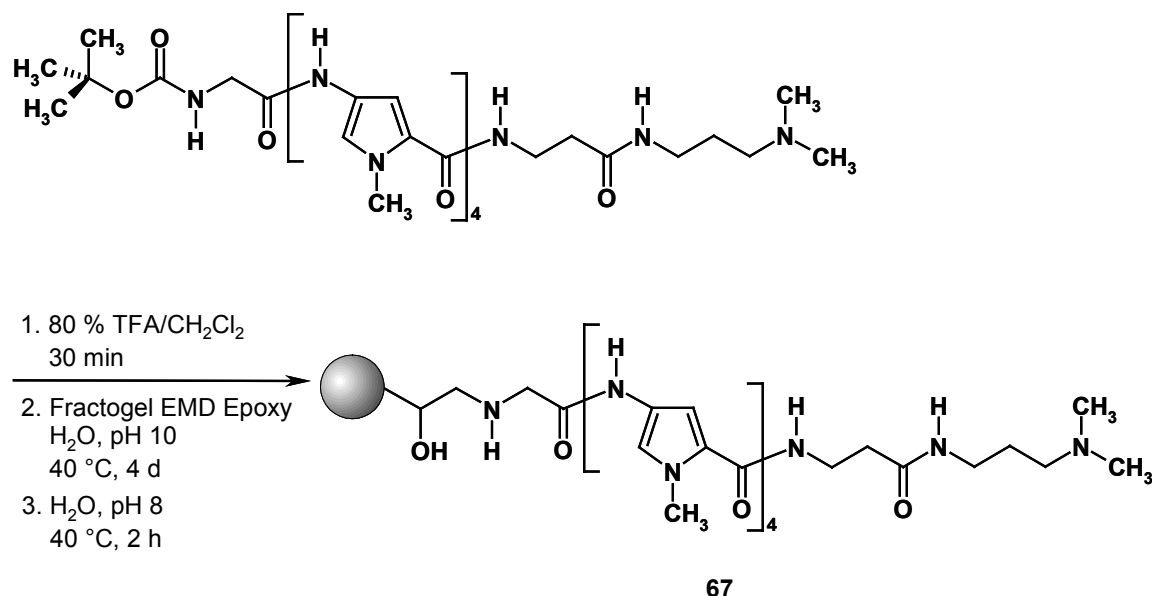


Abb. 27: Immobilisierung des Oligocarboxamids **66** auf Fractogel® EMD Epoxy.

1.1.5 Untersuchung der Bindungseigenschaften des funktionalisierten Polymers Fractogel-Gly-(Py)₄-β-Dp an Plasmid-dDNS

Die Bindung des immobilisierten Oligoamids an dDNS wird photometrisch bestimmt. Die Kapazität für die verwendete Desoxyribonukleinsäure kann dabei in einem UV-Essay aus der Absorption der Reaktionslösung bei 260 nm errechnet werden. Dazu wird das Fractogel-Gly-(Py)₄-β-Dp in einem geeigneten Puffer mit der dDNS inkubiert und die überstehende Lösung, nach der Abtrennung vom Trägermaterial mittels Zentrifugation, analysiert.

Aufgrund der vier *N*-Methylpyrrol-Bausteine sollte der immobilisierte Ligand besonders an AT-reiche Sequenzen einer doppelhelicalen DNS bzw. eines Plasmids binden. Aus diesem Grund wird als Bindungspartner der Vektor „pTriEx™-1 DNA“ eingesetzt.¹⁴⁹ Es handelt sich dabei um ein Plasmid, das verschiedene poly(AT)-Sequenzen aufweist. Um die erhaltenen Ergebnisse einschätzen zu können, wird in einer Vergleichsreihe die Bindung dieses Vektors an das Fractogel®-TMAE HiCap,¹⁵⁰ dessen Eigenschaften bekannt sind, untersucht. Hierbei handelt es sich um einen kommerziell erhältlichen Ionentauscher, der als Affinitätsgruppe das quartäre Ammoniumsalz Trimethylaminoethyl trägt. Der deaktivierte Fractogel® EMD-Basisträger dient als Negativkontrolle für die Versuche. Die Deaktivierung wurde analog zu oben Beschriebenem durchgeführt.

Als günstigster Puffer für die Messungen hat sich ein 10 mM TrisHCl-Puffer (pH 7) erwiesen, dem 10 mM NaCl sowie 1 mM EDTA zugesetzt werden. Bei Verwendung von höheren Salzkonzentrationen (500 mM bzw. 1000 mM NaCl) zeigte sich eine niedrigere Kapazität für das verwendete Plasmid, wohingegen eine Änderung des pH-Wertes nur einen geringen Einfluß auf die Bindung hat. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

	Fractogel-Gly-(Py) ₄ -β-Dp (20-40µm)	Fractogel [®] -TMAE HiCap (40-90µm)
Liganden-Dichte	≈ 50 µmol/ml	≈ 100 µmol/ml
Kapazität für „pTriEx TM -1 DNA“	≤ 200 µg/ml	2000 µg/ml
Bindungszeit	Stunden	Minuten

Tab. 1: Ergebnisse des UV-Assays für die Bindung von „pTriExTM-1 DNA“ an Fractogel-Gly-(Py)₄-β-Dp (**67**) bzw. Fractogel[®]-TMAE HiCap.

Das synthetisierte Fractogel-Gly-(Py)₄-β-Dp (**67**) zeigt eine Kapazität für „pTriExTM-1 DNA“, die, bei Zugrundelegung gleicher Ligandendichten der beiden funktionalisierten Polymere, etwa um den Faktor 5 kleiner ist als die des untersuchten Ionentauschers. Dies wäre zwar für eine effiziente Aufreinigung von Plasmiden verhältnismäßig gering, für eine Trennung von dDNS-Fragmenten aber möglicherweise ausreichend.

Die Bindungszeit, d.h. die Inkubationszeit, nach der eine maximale Kapazität erreicht wird, beträt im Falle des Fractogel-Oligoamid-Harzes mehrere Stunden, wohingegen das Maximum bei dem Ionentauscher schon nach wenigen Minuten beobachtet wird.

Probleme ergeben sich allerdings beim Resuspendieren des funktionalisierten Polymers. Nach Erhitzen in dem verwendeten Bindungspuffer (5 min, 80 °C) zeigt sich eine deutliche Zunahme der Absorptionswerte im Bereich zwischen 230 und 320 nm. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung zwischen dem Oligoamid und dem polymeren Trägermaterial unter diesen Bedingungen nicht stabil ist. Offensichtlich ist das Fractogel[®] EMD Epoxy als Matrix für diese Verwendung nicht geeignet. In weiteren Experimenten müssten demnach Harze eingesetzt werden, die eine stabilere Bindung zu dem Affinitätsliganden ausbilden.

1.2 Wege zur Entwicklung eines Biosensors für die sequenzspezifische Erkennung von dDNS in Lösung²

1.2.1 Einführung

Die Entwicklung von Biosensoren beispielsweise zur Diagnose von Krankheiten, zur Entwicklung von Arzneistoffen oder zum Studium biomolekularer Reaktionen ist von großem Interesse.¹⁵¹ Das grundlegende Aufbauprinzip derartiger Sensoren besteht in der Kopplung einer spezifischen (siehe Kapitel 1.1.1 des Hauptteils) Ligand-Rezeptor Wechselwirkung mit einer signalgebenden Einheit. Der jeweilige Ligand wird dabei in der Mehrzahl der Fälle über eine endständige Alkan-Thiol-Einheit auf einer planaren Metalloberfläche, meist Gold, immobilisiert. Monoschichten solcher Thiole, sogenannte „Self Assembled Monolayers (SAMs)“¹⁵² weisen ideale Strukturmerkmale für das Studium der molekularen Erkennung an festen Oberflächen auf.¹⁵³

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind eine Vielzahl von Biosensoren basierend auf optischen,¹⁵⁴ radioaktiven,¹⁵⁵ elektrochemischen,¹⁵⁶ piezoelektrischen,¹⁵⁷ magnetischen,¹⁵⁸ mikromechanischen¹⁵⁹ oder massenspektrometrischen¹⁶⁰ Signaltransduktions-Methoden entwickelt worden. Unter den verschiedenen Techniken kommen in vielen affinitäts-biosensorischen Anwendungen, wie beispielsweise dem Studium von Protein-DNS Interaktionen,¹⁶¹ vor allem optische Detektionsmethoden, basierend auf der sogenannten „Surface Plasmon Resonance (SPR)“,¹⁶²⁻¹⁶⁴ zum Einsatz.^{154,165} Mittels dieses Verfahrens können geringe Änderungen der Brechungsindices an der Grenzfläche zwischen einem Analyten und einer Metalloberfläche, die aus der Wechselwirkung eines Rezeptors mit dem immobilisierten Liganden resultieren, spektroskopisch detektiert werden.^{151,165b}

Im Folgenden soll ein *N*-Methylpyrrol-Oligoamid synthetisiert werden, welches über ein endständiges Cystein auf einer Goldoberfläche verankert werden kann. Mittels des Ethidiumbromid-Verdrängungs-Essays soll ein möglicher Einfluss des endständigen Cystein-Bausteins auf die Bindungskonstante dieses Derivates mit dDNS untersucht werden. Die Bindungseigenschaften dieses immobilisierten Liganden mit Oligonukleotiden sollen anschließend SPR-spektroskopisch untersucht werden.

² Das Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Graffinity, Heidelberg durchgeführt.

1.2.2 Festphasensynthese

Die Darstellung des Bausteins Boc-Cys(pMB)-Gly-(Py)₄-β-Dp (**68**, Abbildung 28) erfolgt in Analogie zu der in Kapitel 1.1.3.2 besprochenen Festphasensynthese. Als Monomer kommt wiederum der am *N*-Terminus geschützte Aktivester des *N*-Methylpyrrols (**65**, Abbildung 23) zum Einsatz. Die Anknüpfung des endständigen Seitenketten-geschützten Cysteins Boc-Cys(pMB)-OH gelingt durch eine *in-situ* Aktivierung mit HBTU unter Zusatz der Base DIEA. Vollständiger Umsatz ist dabei nach einer Kupplungszeit von 120 Minuten zu beobachten.

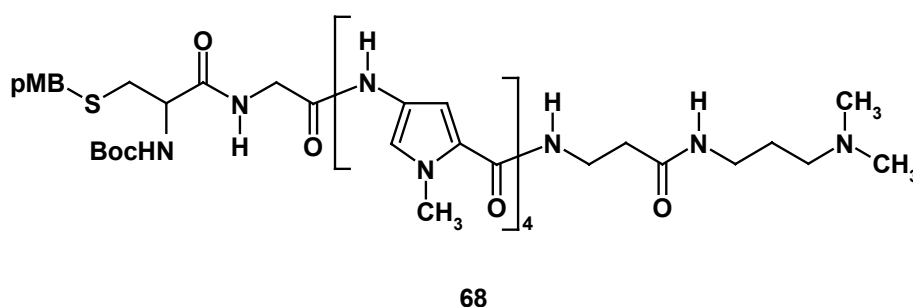


Abb. 28: Struktur von Boc-Cys(pMB)-Gly-(Py)₄-β-Dp (**68**, pMB: p-Methoxybenzyl).

Nach Abspalten von der festen Phase und Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC (Abbildung 29) wird **68** in Form eines farblosen Feststoffs in 85 % Ausbeute erhalten.¹⁴⁷

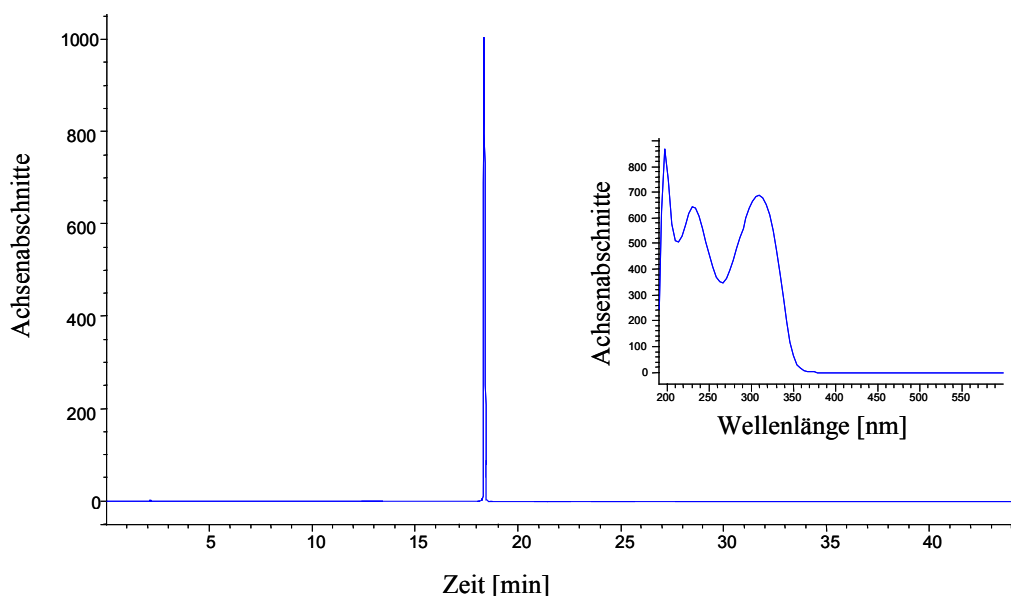


Abb. 29: Analytisches Chromatogramm und zugehöriges UV/VIS-Spektrum des Oligoamides Boc-Cys(pMB)-Gly-(Py)₄-β-Dp (**68**) nach semipräparativer Trennung.

1.2.3 Immobilisierung und Bindungseigenschaften

Die Bindungskonstante von Boc-Cys(pMB)-Gly-(Py)₄-β-Dp (**68**) an dDNS kann über die Verdrängung von interkaliertem Ethidiumbromid (EtBr) bestimmt werden.⁴⁷ Die Messungen werden in Wasser unter physiologischen Bedingungen mit einem Tis/HCl-Puffer (pH 7.4, 50 mmol/l NaCl) bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Oligonukleotid wird Kalbs-Thymus dDNS verwendet, welche sowohl AT- als auch GC-Basenpaare aufweist. Die Bindungskonstante errechnet sich nach folgender Formel:

$$c(\text{EtBr}) \times K(\text{EtBr}) = c(\mathbf{68}) \times K(\mathbf{68})$$

c: Konzentration [l⁻¹]
K: Bindungskonstante [M⁻¹]

Diese Beziehung gilt genau dann, wenn nach Zugabe eines definierten Volumens der Lösung von **68** die Hälfte der Ausgangsfluoreszenzintensität erreicht wird (sogenannter 50 %-Wert).

Die Konzentration des Ethidiumbromids ($1.30 \times 10^{-6} \text{ l}^{-1}$) sowie dessen Bindungskonstante an dDNS ($1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) sind bekannt.^{166,167} Die Konzentration von **68** lässt sich aus dem bis zum 50 %-Wert zugegebenen Volumen berechnen.

Für die Bindungskonstante von Boc-Cys(pMB)-Gly-(Py)₄-β-Dp (**68**) wird ein Wert von $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ erhalten.¹⁶⁸ Dieser Wert liegt im Bereich der Affinitäten vergleichbarer literaturbeschriebener Verbindungen.⁷⁵

Um das Derivat auf einer Goldoberfläche immobilisieren zu können, muss die pMB-Schutzgruppe an der Schwefel-Funktion abgetrennt werden. Die Abspaltung, bei der gleichzeitig der N-Terminus entschützt wird, gelingt mit siedender TFA (75 °C, 1 h). Die Vollständigkeit der Freisetzung wird massenspektrometrisch verifiziert.

Das so erhaltene Thiol-Derivat wird ohne weitere Aufreinigung auf einer Gold-überzogenen Glasoberfläche immobilisiert. Da es sich hierbei um eine von der Firma Graffinity entwickelte Technologie handelt, können keine näheren Angaben bezüglich der Durchführung gemacht werden.

Bei dem anschließenden Screening gegen eine geeignete dDNS konnte keine Bindung beobachtet werden.¹⁶⁹ Dieser Befund kann durch unterschiedliche Überlegungen erklärt werden. Zum einen könnte durch die Immobilisierung auf der Goldoberfläche die Bindungskonstante des Oligoamids mit dDNS erniedrigt werden. Da die untere Detektionsgrenze dieses Verfahrens im millimolaren Bereich liegt (entspricht Bindungskonstanten von 10^3) könnten eventuell auftretende Wechselwirkungen bei

einer Erniedrigung der Bindungskonstante um den Faktor 10 nicht mehr erfasst werden. Zum anderen wird durch die Verankerung auf der Oberfläche eine antiparallele „side by side“ Einlagerung der Oligoamidstränge in die kleine Furche der dDNS verhindert. Dies geht ebenfalls mit einer Verringerung der Bindungskonstante einher. Abhilfe könnte die Synthese von längeren Oligoamid-Sequenzen mit Hairpinstruktur schaffen, die höhere Affinitäten mit doppelsträngiger Desoxyribonucleinsäure aufweisen (siehe Kapitel 2 der Einleitung).

Des Weiteren ist es denkbar, dass sich die immobilisierten Oligoamide parallel zur Oberfläche anordnen, was eine Bindung an dDNS verhindern würde. In diesem Falle müssten die Thiol-Spacer variiert werden.

2 Synthese und Eigenschaften eines potentiell sequenz-spezifisch DNS-hydrolysierenden Kobalt(III)-Cyclen Komplexes³

2.1 Einführung

Die hohe Stabilität von DNS – sie hydrolysiert unter physiologischen Bedingungen mit einer Halbwertszeit von 200 Millionen Jahren¹⁷⁰ – ist im Hinblick auf die Speicherung der genetischen Information von großer Bedeutung. Neben einer Reihe von Hydrolyseenzymen sind auch verschiedene Metallionen in der Lage, das Phosphat-Rückgrat der DNS zu spalten. So hydrolysieren insbesondere Lanthanoidionen¹⁷¹ und Kobalt(III)komplexe unterschiedlicher Aza-Verbindungen¹⁷²⁻¹⁷⁴ Phosphorsäurediester. Die direkte Untersuchung der Hydrolyseaktivität von Metallkomplexen gegenüber DNS ist analytisch schwierig.¹⁷⁵ Bisnitrophenylphosphorsäurediester (BNPP), der unter physiologischen Bedingungen ebenfalls nur langsam hydrolysiert ($k = 1.1 \cdot 10^{-11} \text{ s}^{-1}$) wird daher vielfach als Modellsubstanz verwendet. Abbildung 30 zeigt exemplarisch den Mechanismus der hydrolytischen Spaltung dieses Esters durch das Kobalt(III)-Cyclen **69**.^{176,177} Zur Spaltung des Phosphordiester sind zwei Wassermoleküle nötig, die benachbart zueinander in der oktaedrischen Koordinationssphäre des Kobalts vorliegen müssen. Im Verlauf der Hydrolyse wird ein H₂O gegen BNPP ausgetauscht, während das zweite Wassermolekül die entstandene P-O-Bindung intramolekular angreift (Abbildung 30). Die Aufnahme der Kinetik beruht auf der Messung des UV-spektroskopischen Detektion des entstehenden *p*-Nitrophenolats, das bei 400 nm eine charakteristische Absorption zeigt.

³ Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit M. Subat durchgeführt.

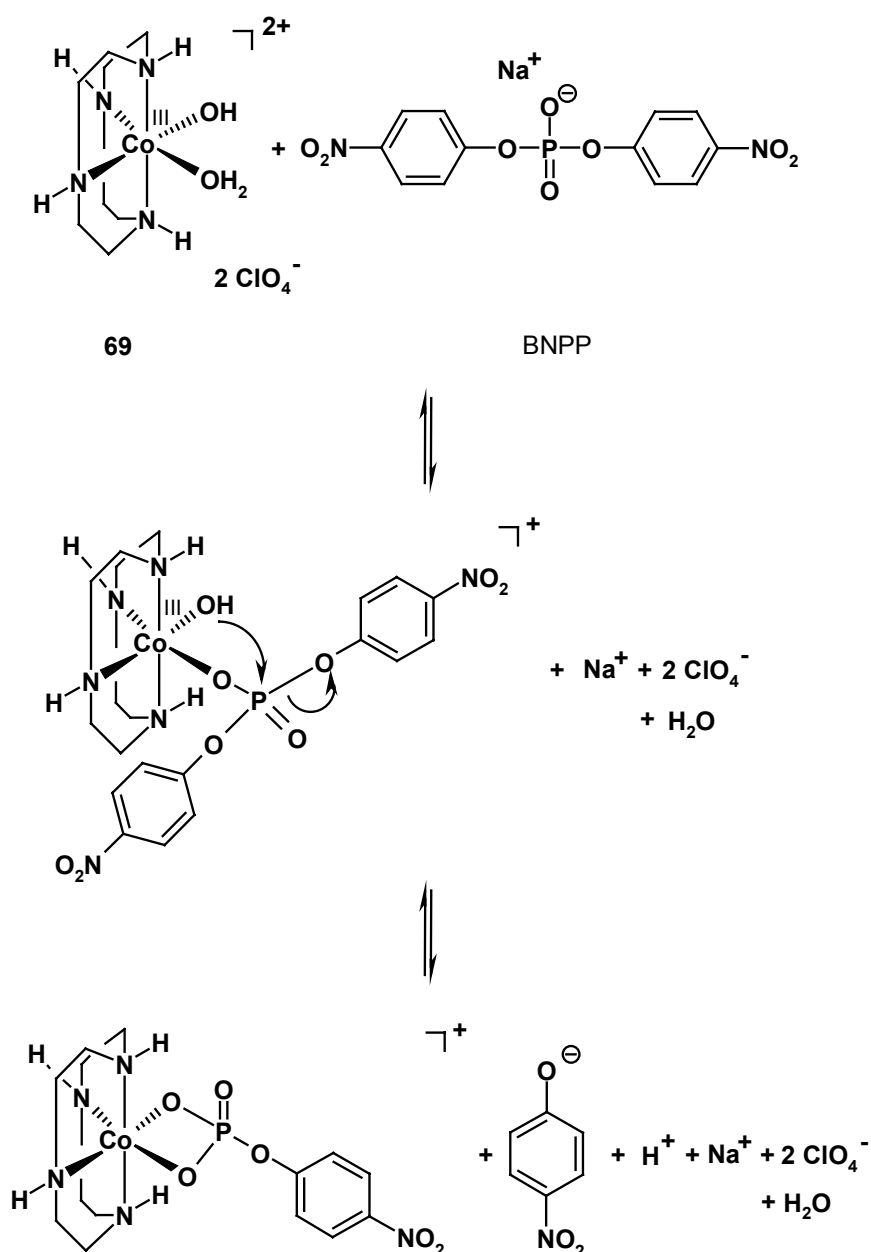


Abb. 30: Mechanismus der hydrolytischen Spaltung von BNPP durch Kobalt(III)-Cyclen 69.

Die Wechselwirkung derartiger Komplexe mit dem Phosphat-Rückgrat der DNS sind jedoch weitgehend unspezifisch, weshalb keine bevorzugte Position für die Phosphorsäureesterspaltung zu erwarten ist. Eine Verbindung, die aus einer sequenzspezifisch bindenden Einheit und einem hydrolyseaktiven Kobalt(III) Komplex aufgebaut ist, könnte hingegen den Weg für eine sequenzspezifische Hydrolyse der DNS ebnen. Abbildung 31 zeigt eine derartige Zielstruktur, die von *M. Pelka*¹⁷⁶ und *M. Rödel*¹⁷⁷ synthetisiert wurde. Die Sequenzspezifität des Komplexes wird hierbei durch

ein *N*-Methylpyrrolcarboxamid erreicht, das über ein endständiges β -Alanin an den freien *C*-Terminus eines funktionalisierten Cyclen-Derivates gekoppelt wurde.

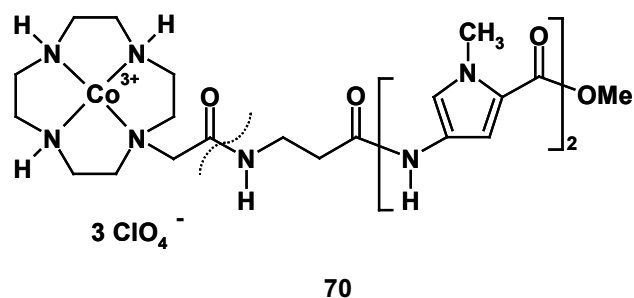


Abb. 31: Kobalt(III)-Cyclen Komplex **70** von *M. Pelka* und *M. Rödel*. Die gestrichelte Linie zeigt die Verknüpfungsstelle der beiden synthetisierten Teilstrukturen.

Im Gegensatz zu dem unsubstituierten Kobalt(III)-Cyclen **69** zeigt der Komplex **70** keinerlei Hydrolyseaktivität gegenüber verschiedenen Phosphorsäurediestern.^{176,177} Die Autoren führen diese Ergebnisse auf die Rückkoordination der benachbarten Carbonylgruppe an das Kobalt zurück (Abbildung 32). Dadurch wird das für die Hydrolyse nötige Wassermolekül (siehe Abbildung 30) aus der Koordinationssphäre des Kobalts verdrängt, was den beobachteten Verlust der Hydrolyseaktivität des Komplexes **70** zur Folge hätte.

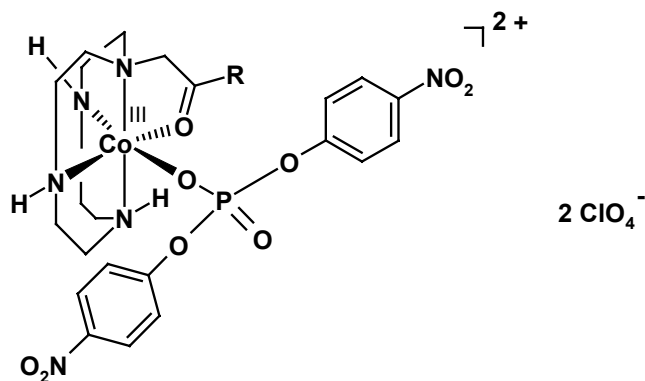


Abb. 32: Mögliche Rückkoordination der benachbarten Carbonyl-Gruppe an das Kobalt des Komplexes **70**.

Basierend auf diesen Untersuchungen soll im Folgenden die Synthese eines Komplexes beschrieben werden, dessen Teilstrukturen über einen starren Spacer verbrückt sind. Dies soll eine mögliche Rückkoordination der Oligoamidkette an das Kobalt verhindern. In ersten UV-spektroskopischen Messungen soll die Hydrolyseaktivität des synthetisierten Komplexes gegenüber BNPP untersucht werden.

2.2 Synthese des Kobalt(III)-Cyclen Komplexes

Die Synthese des Zielmoleküls beginnt mit der Darstellung der sequenzspezifisch bindenden Einheit. Hierbei wird das dimere *N*-Methylpyrrolcarboxamid **73** aufgebaut, das anschließend über den freien C-Terminus an ein geeignetes Cyclen-Derivat gekuppelt wird. Da die Synthese literaturbekannt ist, soll im Folgenden nur kurz darauf eingegangen werden.¹⁷⁸

Die Umsetzung der freien Säure **71**, die durch Verseifung des bereits beschriebenen Methylesters **62** (siehe Abbildung 23) erhalten wird, mit Thionylchlorid in THF unter DMF-Katalyse liefert das Säurechlorid **72** (Abbildung 33). Parallel dazu wird die Nitro-Gruppe von **62** mittels Wasserstoff und Pd/C (10 % Pd) in EtOAc reduziert. Das so erhaltene instabile Amin wird *in situ* mit **72** umgesetzt. Nachfolgende Abspaltung des Esters liefert das C-terminal ungeschützte Dimer **73**.

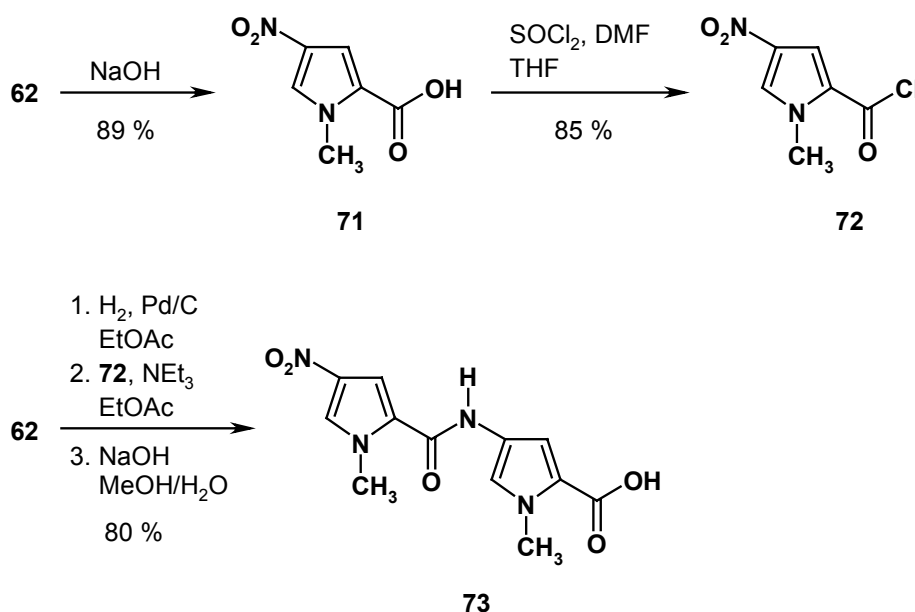


Abb. 33: Darstellung des dimeren *N*-Methylpyrrolcarboxamid-Derivates **73**.

Im zweiten Teil der Synthese muss ein Cyclen-Derivat mit einer freien NH_2 -Funktion aufgebaut werden, über die das Oligoamid **73** angekuppelt werden kann. Dazu wird das 1,4,7-Tris-*tert*-butyloxycarbonyl-1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecan **74**¹⁷⁹ mit dem *Sanger*-Reagenz 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol unter Zusatz von NaHCO_3 in Acetonitril zum Derivat **75** umgesetzt (Abbildung 34).¹⁸⁰ Anschließende Reaktion der Dinitroverbindung mit Natriumsulfid/Schwefel liefert das Mono-Reduktionsprodukt **76** in guten Ausbeuten.¹⁸¹ Wird die Reaktionsmischung 40 min bei 90 °C belassen, kann das Diamin **77** isoliert werden. Die Ausbeuten bei dieser Reaktion sind allerdings nur

schlecht. Einen effektiveren Zugang zu dem Diamino-Derivat liefert hingegen die Reduktion von **75** mit Wasserstoff unter Palladium-Katalyse. Nach 48 h bei Raumtemperatur wird **77** in Form eines schwach gelben Feststoffs in 74 %iger Ausbeute isoliert. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, einen Komplex mit zwei Oligoamid-Seitenketten aufzubauen. Im Folgenden wird als eine erste Testverbindung nur das einfach derivatisierte Cyclen synthetisiert.

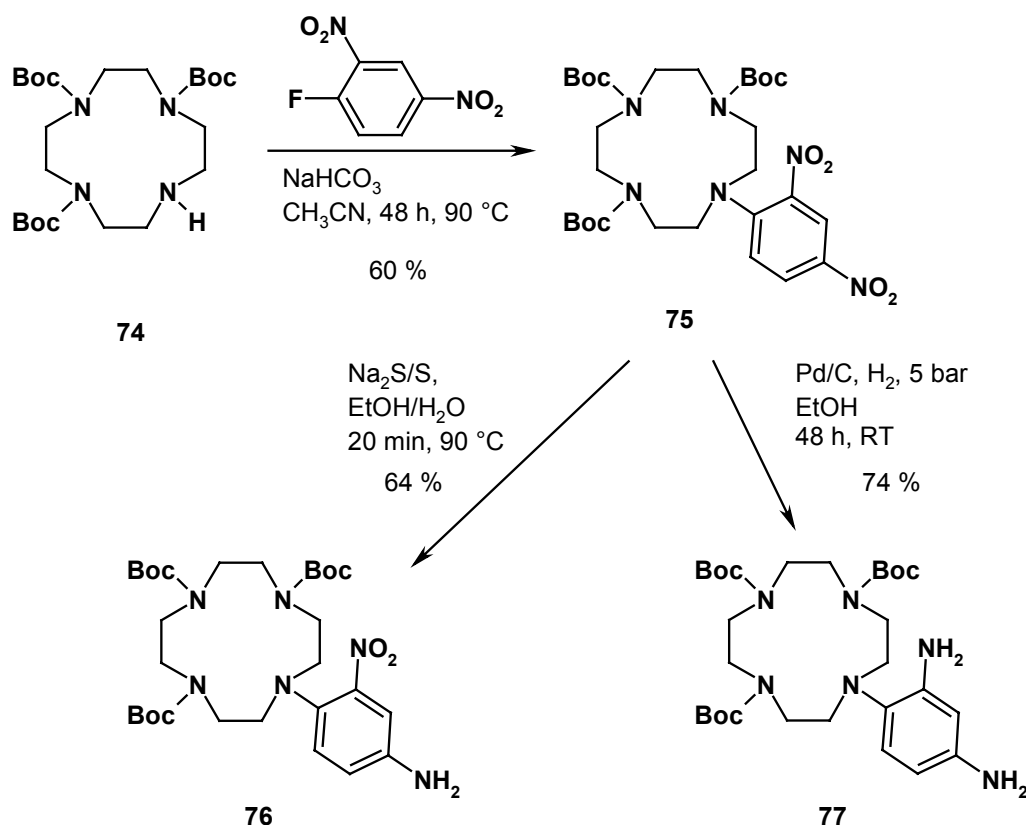


Abb. 34: Darstellung der Cyclen-Derivate **76** und **77**.

Die Derivate **73** und **76** können nun in DMF unter Peptidkupplungsbedingungen miteinander verknüpft werden (Abbildung 35). Als Kupplungsreagenz kommt eine Mischung aus HATU, HOAt und der Base Collidin zum Einsatz. Die Cyclen-Oligoamid-Spezies **78** wird als gelber Feststoff in 82 %iger Ausbeute isoliert. Die Abspaltung der BOC-Schutzgruppen erfolgt mit TFA in CH_2Cl_2 (60:40, v/v) unter Zusatz von wenig Methanol, wodurch die dreifach positiv geladene Verbindung **79** in quantitativer Ausbeute (gelber Feststoff) erhalten wird. Anschließend werden die Amine durch Eluieren über einen stark basischen Ionentauscher freigesetzt (**80**, quantitative Ausbeute, gelber Feststoff). Die nachfolgende Bildung des Kobalt(III)-Cyclen Komplexes **81-Cl** gelingt durch Erhitzen der Verbindung **80** mit

$\text{Na}_3[\text{Co}(\text{CO}_3)_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ in einer Mischung aus Methanol und Wasser. Nach Zugabe von konzentrierter HCl fällt der Chloro-Komplex **81-Cl** in Form eines gelblich-grünen Feststoffs mit quantitativer Ausbeute an. Das hier eingesetzte Kobalt(III)-Salz lässt sich in einer literaturbekannten Synthese durch Oxidation von $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ mit Wasserstoffperoxid darstellen.¹⁸²

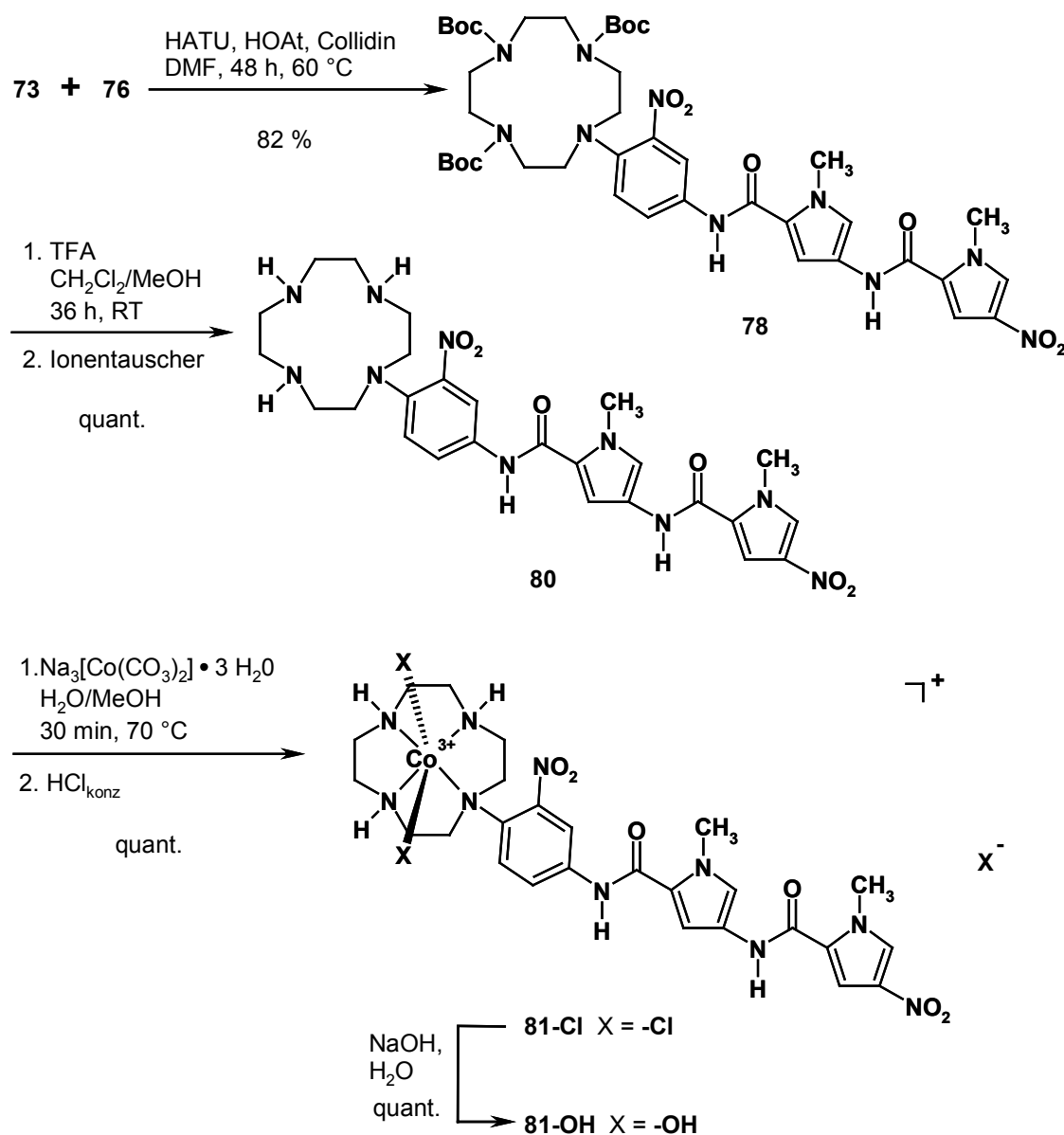


Abb. 35: Darstellung des Kobalt(III)-Cyclen Komplexes **81-Cl** und **81-OH**.

Das Überführen des Chloro-Komplexes **81-Cl** in den für die Untersuchungen benötigten Aquo-Komplex (siehe Abbildung 30) gelingt durch Behandeln mit wässriger NaOH (Abbildung 35).

81-OH wird nun auf Hydrolyseaktivität gegenüber dem BNPP-Ester untersucht.

3 Molekulare Erkennung von Naturstoffen mit Imid-Einheiten durch polymergebundenes Zink(II)-Cyclen⁴

3.1 Einführung

Reversible koordinative Metall-Ligand Wechselwirkungen treten in vielen biologischen Systemen auf.¹⁸³⁻¹⁸⁶ Da die natürlichen Rezeptoren sehr komplex sind, wird dieses Bindungsmotiv anhand kleinerer Moleküle studiert. Als Modellverbindungen kommen häufig Azamakrocyclen zum Einsatz, mit Hilfe derer das Metallatom gebunden wird.¹⁸⁷⁻¹⁹⁰ Vor allem Zink-Komplexe des 1,4,7,10-Tetraazacyclododekans (Cyclen)¹⁷⁹ besitzen dabei interessante Anwendungen im Bereich der molekularen Erkennung und Katalyse.¹⁹¹

Abbildung 36 zeigt die Struktur von Zn(II)-Cyclen in Wasser. Der Komplex besitzt eine leicht verzerrte quadratisch-planare Geometrie, wobei das zentrale Metallatom aus der Ebene, die von den vier Stickstoffatomen gebildet wird, herausragt. Ein axial gebundenes Wassermolekül vervollständigt die Koordinationssphäre.

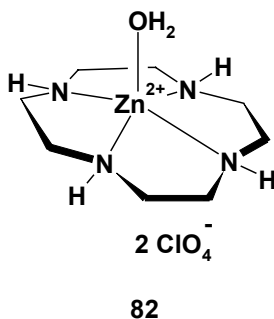


Abb. 36: Struktur und Koordinationssphäre von Zn(II)-Cyclen in Wasser.

Eine charakteristische und für die molekulare Erkennung wichtige Eigenschaft von Zn(II)-Cyclen ist die Lewis-Acidität. Das koordinierte Wassermolekül besitzt einen pK_s -Wert von 7.9,¹⁹² was deutlich saurer ist als der pK_s von 9.0¹⁹³ für freie, solvatisierte Zn^{2+} -Ionen in wässriger Lösung.

⁴ Die Ergebnisse dieses Projekts wurden bereits veröffentlicht: König, B.; Gallmeier, H.-C.; Reichenbach-Klinke, R.; *Chem. Commun.* **2001**, 2390-2391. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit R. Reichenbach-Klinke durchgeführt.

Das axial koordinierende Wasser kann durch andere Lewisbasen ersetzt werden. So kann beispielsweise eine deprotonierte Imid-Funktion durch **82** gebunden werden,¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ wobei der negativ geladene Stickstoff an das Lewis-acide Metallatom koordiniert (Abbildung 37). Diese Bindung wird zudem durch Wasserstoffbrücken zwischen den NH-Funktionen des Cyclens und den Carbonyl-Sauerstoffen des Imids verstärkt.

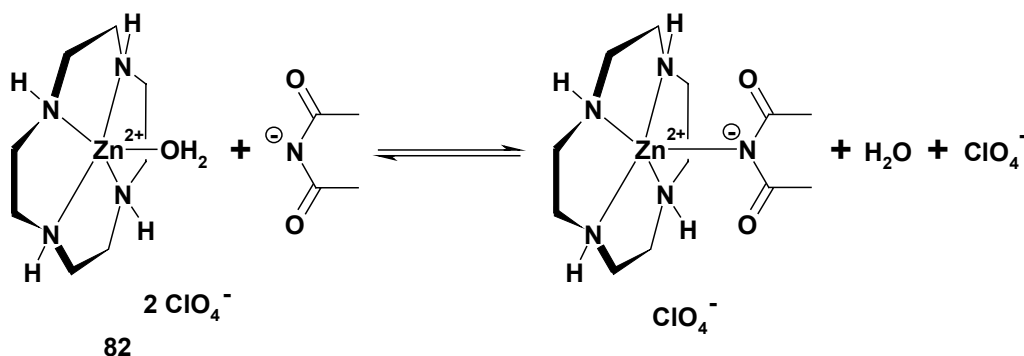


Abb. 37: Bindung einer Imid-Funktion an Zn(II)-Cyclen **82**.

Diese erstmals von der Arbeitsgruppe um *Kimura* beobachtete Zn(II)-Cyclen – Imid Koordination¹⁹⁴ wurde zum Aufbau vieler künstlicher Rezeptoren für Barbiturate,¹⁹⁷ Thymine¹⁹⁸ und Flavine¹⁹⁶ verwendet.

3.2 Synthese von polymergebundenem Zn(II)-Cyclen

Die quantitative Bestimmung von Vitamin B 2 (Riboflavin) im Urin, in Blutplasma und in Vitamintabletten ist von analytischer Bedeutung.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Daher soll nun, basierend auf der oben besprochenen Zn(II)-Cyclen – Imid Bindung, eine quantitative Analytik von Riboflavin entwickelt werden.

Um dies zu erreichen, wird zunächst ein Polymer mit Zn(II)-Cyclen Bindungsstellen funktionalisiert. Dazu wird das 1,4,7-Tris-*tert*-butyloxycarbonyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecan **74**¹⁷⁹ an Fractogel® EMD Epoxy¹⁴⁸ (siehe auch Kapitel 1.1.4) gekoppelt. Nach dem Deaktivieren der verbleibenden reaktiven Epoxidgruppen werden die Boc-Schutzgruppen durch Behandlung mit TFA abgespalten (Abbildung 38). Die Beladung des Polymers lässt sich aus der Elementaranalyse von **83** berechnen. Es ergibt sich eine Belegung von 0.14 mmol Cyclen/g Polymer.

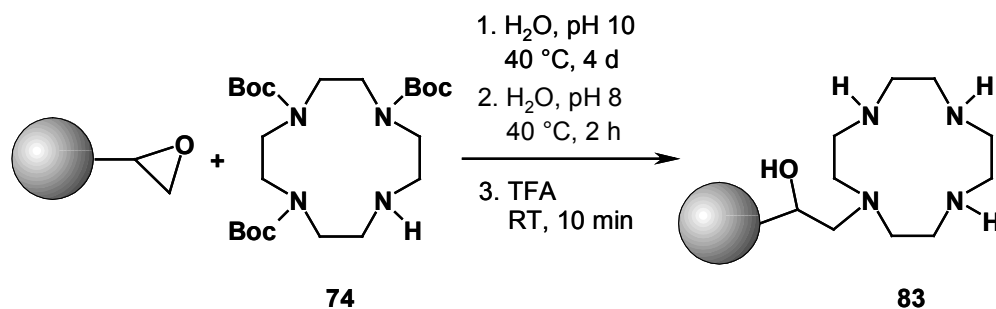


Abb. 38: Synthese des polymergebundenen Cyclens **83**.

Die Darstellung des entsprechenden Zn(II)-Komplexes erfolgt durch Umsetzung von **83** mit einer wässrigen Zink(II)-perchlorat-hexahydrat Lösung (Abbildung 39). Die, ebenfalls mittels Elementaranalyse bestimmte, Beladung des Komplexes **84** ($0.15 \text{ mmol Zn(II)-Cyclen/g Polymer}$), zeigt im Rahmen der Fehlergrenze gute Übereinstimmung mit dem für **83** erhaltenen Wert. Daraus lässt sich eine vollständige Komplexierung der Azamacrocyclen durch Zn^{2+} schlussfolgern.

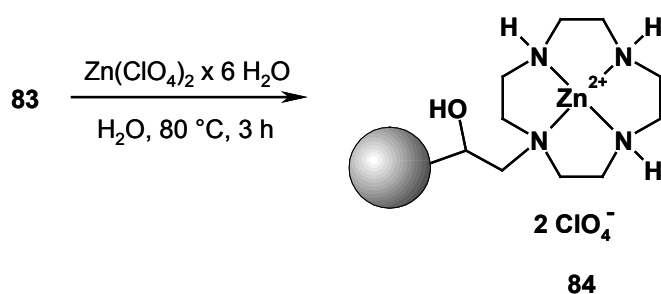


Abb. 39: Synthese des polymergebundenen Zn(II)-Cyclen Komplexes **84**.

3.3 Molekulare Erkennung von Vitamin B2

3.3.1 Bindung von Riboflavin bzw. Riboflavintetraacetat an **84**

Aufgrund der großen Anzahl von Bindungsstellen auf dem funktionalisierten Polymer **84**, sollte eine quantitative Isolierung von Flavin aus einer wässrigen Lösung möglich sein. Um dies zu verifizieren, werden 1.0 g des funktionalisierten Harzes **84** in eine Chromatographiesäule gefüllt und 10 ml einer physiologischen Riboflavinlösung ($c = 4.9 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ in Tris/HCl-Puffer, pH 7.4) über das Polymer gegeben.

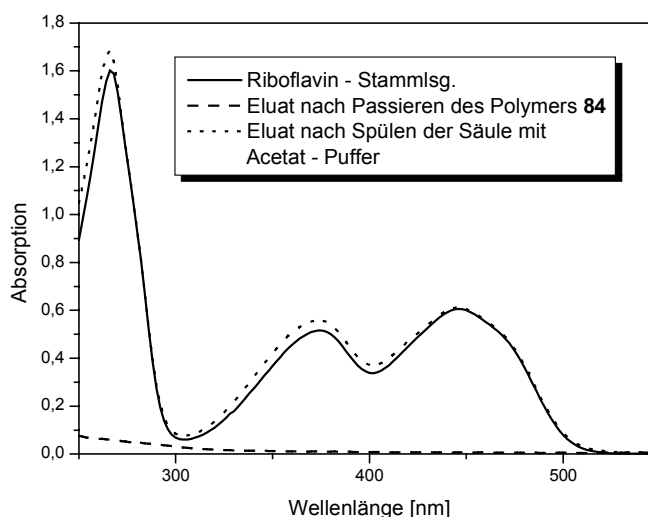


Abb. 40: UV/VIS-Spektren der verschiedenen Pufferlösungen.

Wie in Abbildung 40 deutlich zu erkennen ist, wird das Riboflavin quantitativ gebunden. Die typischen Absorptionen des Flavins sind im Eluat nach dem Passieren der polymerbeladenen Säule vollständig verschwunden. Das gebundene Flavin kann anschließend mit einem schwach sauren Puffer (Acetatpuffer, pH 4.4) wieder vollständig vom Polymer gewaschen werden. Das erhaltene Spektrum der sauren Waschlösung ist identisch mit dem der Riboflavin-Stammlösung.

Um sicherzustellen, dass es sich bei der beobachteten Bindung nicht nur um Adsorption am polymeren Material handelt, wird ein Kontrollexperiment mit einem Fractogel® EMD Epoxy durchgeführt, welches durch Behandeln mit Glycin deaktiviert wird und keine Bindungsstellen für Flavin aufweist. Nachfolgend wird eine Riboflavintetraacetatlösung ($c = 5.5 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ in Tris/HCl-Puffer, pH 7.4) über die beiden Polymere gegeben. Die erhaltenen Eluate werden anschließend UV/VIS-spektroskopisch analysiert. Abbildung 41 zeigt, dass durch das nicht-funktionalisierte Harz nur ein geringer Teil des Riboflavintetraacetats zurückgehalten wird, der durch anschließendes Nachspülen mit reinem Puffer aber leicht wieder vom Polymer gewaschen werden kann. Dies lässt auf unspezifische Adsorptionen des Vitamin B2-Derivates an das Harz schließen.

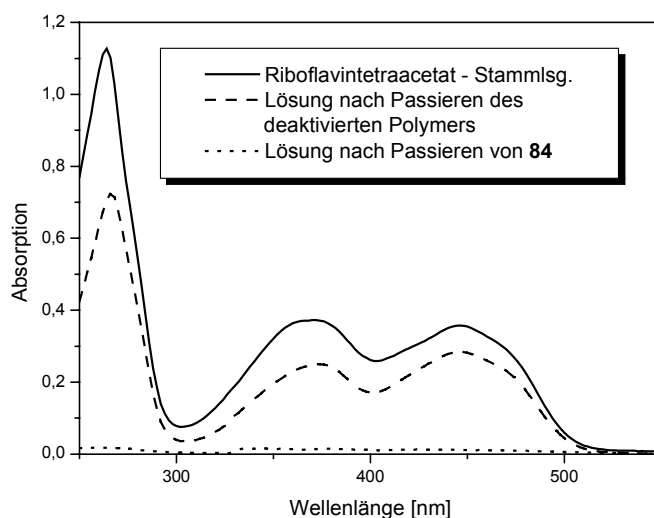


Abb. 41: Vergleich der UV-Spektren von **84** mit einem Polymer ohne Zn(II)-Cyclen Bindungsstellen.

3.3.2 Quantitative Bestimmung von Riboflavin in einer Vitamintablette

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine reversible Bindung von Riboflavin an dem funktionalisierten Polymer **84** möglich ist, soll im Folgenden eine quantitative Analytik des Flavins in einer Vitamintablette⁵ durchgeführt werden. Dazu wird die Tablette in Wasser gelöst und durch Zugabe von NaOH ein pH-Wert zwischen 8 und 9 eingestellt. Im Absorptionsspektrum der Vitamintablette (Abbildung 42) sind neben anderen Banden die charakteristischen Peaks des Riboflavins zu erkennen. Letztere Signale sind nach dem Eluieren der Lösung über das Polymer **84** vollständig verschwunden. Das Flavin wird demnach quantitativ am Polymer gebunden. Nach anschließendem Waschen des Harzes mit Acetatpuffer pH 4,4 sind im Spektrum der Waschlösung nur die typischen Absorptionsbanden von Riboflavin zu erkennen. Daraus lässt sich folgern, dass von der Vielzahl der in der Vitamintablette enthaltenen Substanzen ausschließlich das Flavin gebunden wird. Die quantitative Auswertung des Absorptionsspektrums der Waschlösung ergibt einen Riboflaviningehalt von 1,7 mg pro Tablette. Dieser Wert zeigt im Rahmen der Fehlergrenzen eine gute Übereinstimmung mit der Herstellerangabe (1,6 mg/Tablette).

⁵ Die Vitamintablette mit Orangengeschmack der Firma Krüger GmbH enthält in 100 g neben 35,6 mg Riboflavin: Vitamin B1 (31,1 mg), Vitamin B6 (44,4 mg), Nicotinamid (400 mg), Folsäure (4,4 mg), Vitamin B12 (22,2 µg), Biotin (3,3 mg), Vitamin C (1,33 g), Vitamin E (222 mg), Pantothensäure (133 mg), Kohlenhydrate (7,2 g). Weitere Zutaten sind: Citronensäure, Fructose, Stärke, Natriumbicarbonat, Farbstoff aus Roter Beete, Natriumcyclamat und Natriumsaccharin.

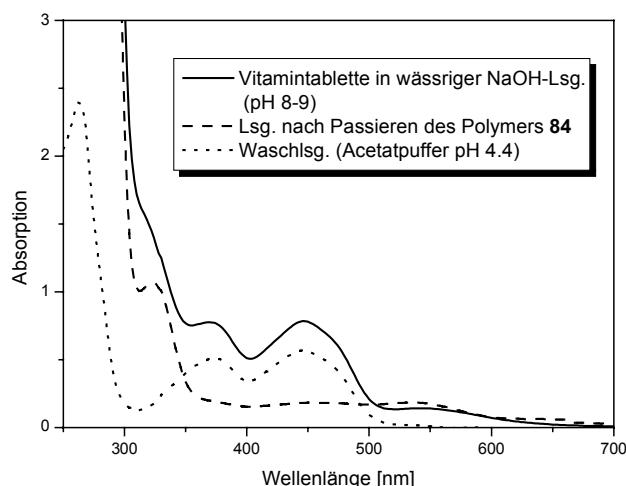


Abb. 42: UV/VIS-Spektren der verschiedenen Lösungen.

3.4 Molekulare Erkennung von Kreatinin

3.4.1 Einführung

Kreatinin ist das Endprodukt des Muskelstoffwechsels und entsteht spontan und irreversibel durch Cyclisierung von Kreatin. Der Kreatinin-Gehalt im Blut bzw. Urin ist direkt proportional zur Muskelmasse eines Individuums. Da die täglich ausgeschüttete Menge an Kreatinin konstant ist, kann diese Verbindung als endogener Stoff für die Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate verwendet werden.³ Sowohl die Analytik als auch die molekulare Erkennung von Kreatinin besitzen daher großes Anwendungspotential in der Medizin.²⁰²

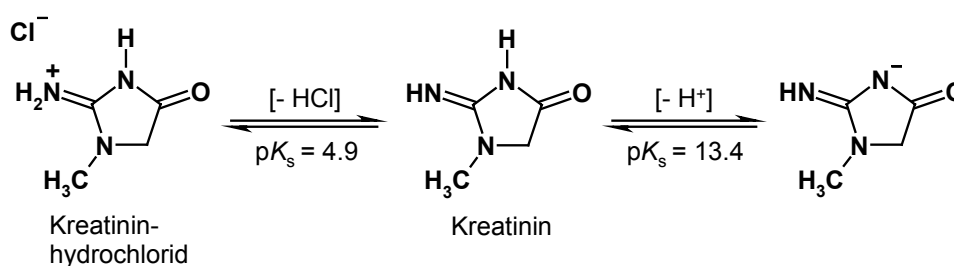


Abb. 43: Durch potentiometrische pH-Titration bestimmte pK_s -Werte von Kreatinin in Wasser.

Kreatinin-hydrochlorid besitzt zwei acide Wasserstoffatome mit pK_s -Werten von 4.9 und 13.4 (Abbildung 43).

Bei der potentiometrischen pH-Titration von Kreatinin-hydrochlorid mit Zn(II)-Cyclen (Abbildung 44) in Wasser wird eine Affinitätskonstante von $\log K = 6.8$ gemessen. Im

Spezies-Verteilungsdiagramm (Abbildung 45) ist zu erkennen, dass bereits bei einem pH-Wert von 8.4 die Hälfte des Kreatinins an das Zn(II)-Cyclen gebunden ist. Die Bindungskonstante zwischen Zn(II)-Cyclen und Kreatinin ist etwa um eine Größenordnung höher als diejenige zwischen Zn(II)-Cyclen und verschiedenen Imiden (siehe Kapitel 3.1). Allerdings ist dieser Unterschied nicht groß genug, um eine Selektivität gegenüber Imiden, wie beispielsweise Riboflavin oder Thymidin, zu erhalten.

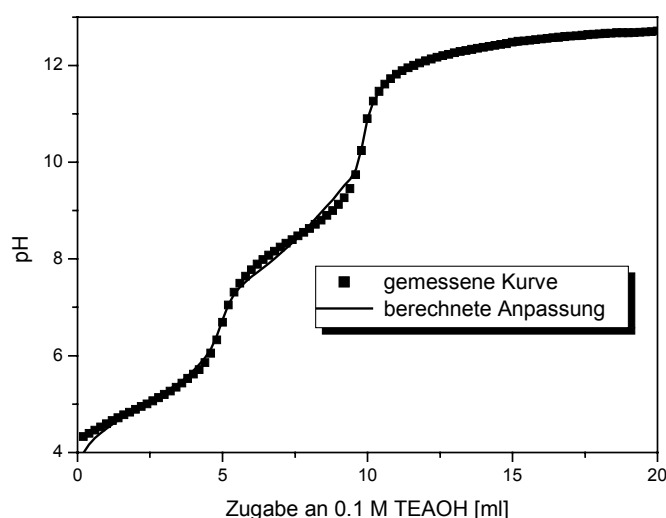


Abb. 44: Potentiometrische pH-Titration von Kreatinin-hydrochlorid und Zn(II)-Cyclen.

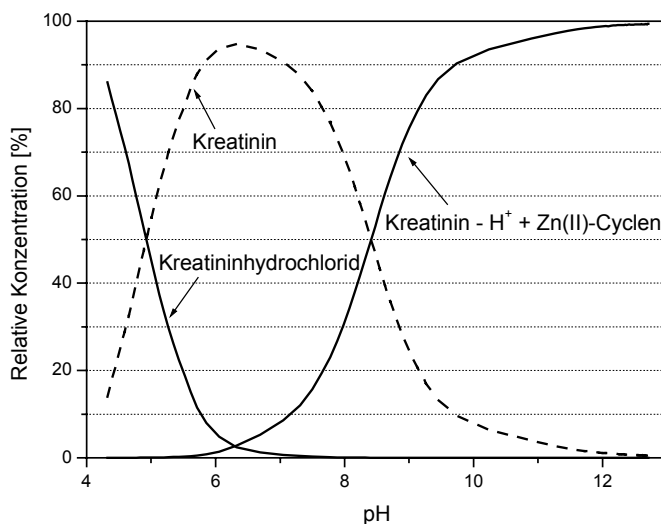


Abb. 45: Spezies-Verteilung im System Kreatinin – Zn(II)-Cyclen.

Die Koordination von Kreatinin an Zn(II)-Cyclen konnte zudem durch eine Röntgenstrukturanalyse verifiziert werden (Abbildung 46).²⁰³ Durch langsames Eindampfen einer äquimolaren Lösung aus Kreatinin und Zn(II)-Cyclen in wässriger

NaOH werden farblose Cokristalle erhalten, die vermessen werden können. Der Abstand zwischen N 5 und Zink beträgt in der Kristallstruktur 1.996 Å. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem Abstand von 2.053 Å zwischen dem imidischen Stickstoff und dem Zink(II) in der Röntgenstruktur von Zn(II)-Cyclen mit 3'-Azido-3'-deoxythymidin.¹⁹⁴ Die Ebene des Kreatinins liegt in etwa zwischen N 1 und N 2 bzw. N 3 und N 4, was an den Abständen zwischen O 1–N 1 (3.175 Å) und O 1–N 2 (3.244 Å) bzw. N 7–N 3 (4.080 Å) und N 7–N 4 (3.915 Å) deutlich wird. Diesen Werten zufolge könnten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen O 1 und N 1 bzw. N 2 möglich sein. Daneben enthält die Elementarzelle ein Wassermolekül, welches deutlich näher an N 3 als an N 4 lokalisiert ist (O 2–N 3: 3.113 Å, O 2–N 4: 5.116 Å). Aufgrund dieser Abstände sind H-Brücken dieses Kristallwassers zu den beiden nächstgelegenen Aminen N 3 und N 7 denkbar (O 2–N 7: 3.395 Å).

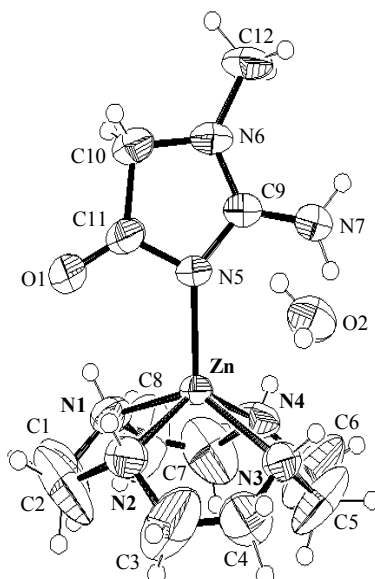


Abb. 46: Röntgenstruktur eines Cokristalls aus Zn(II)-Cyclen und Kreatinin (Die Schwingungsellipsoiden zeigen 50 % Aufenthaltswahrscheinlichkeit an).²⁰⁴ Die Elementarzelle enthält zusätzlich ein Wassermolekül und zwei Perchlorat-Anionen (letztere sind aus Gründen der Übersichtlichkeit hier nicht abgebildet).

3.4.2 Anreicherung von Kreatinin aus hochverdünnten Lösungen

Wie in Kapitel 3.3.2 gezeigt werden konnte, ist mittels des polymergebundenen Zn(II)-Cyclen Komplexes **84** eine quantitative Isolierung von Naturstoffen mit Imid-Strukturen möglich. Kreatinin (siehe Abbildung 43), welches eine zu dieser Gruppe isoelektronische Einheit besitzt,²⁰⁵ sollte ebenfalls durch das funktionalisierte Harz **84**

gebunden werden können. Ziel der nachfolgenden Untersuchungen ist es, Kreatinin aus hochverdünnten Lösungen (μM) anzureichern. Die Bestimmung der Wiederfindungsrate dieses Naturstoffs im Eluat nach Passieren von **84** soll anschließend unter Verwendung der HPLC erfolgen.

Dazu werden 1.0 g des Polymers **84** in eine Chromatographiesäule gefüllt und 1000 ml einer Kreatininlösung ($c = 1.0 \times 10^{-6}$ mol/l in Tris/HCl-Puffer, pH 9) über das Harz gegeben. Das gebundene Kreatinin kann anschließend mit 10 ml eines schwach sauren Puffers (Acetatpuffer, pH 4.4) wieder vom Polymer gewaschen werden, wodurch eine Aufkonzentration der Ausgangslösung um den Faktor 100 erreicht wird. Abbildung 47 zeigt das erhaltene Chromatogramm des Eluats nach Passieren der Säule.

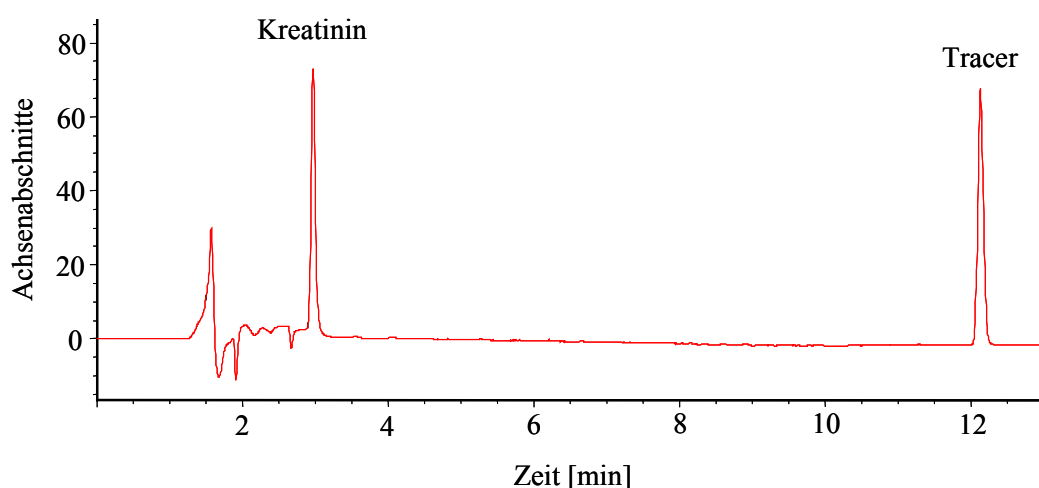


Abb. 47: Ausschnitt aus dem Chromatogramm des Eluats nach Passieren der Säule. Zur Quantifizierung des Kreatinins wurde anschließend ein Tracer (Acetanilid) zugesetzt.

Der Peak bei einer Retentionszeit von 3.0 min konnte mittels LC-MS-Kopplung dem Kreatinin zugewiesen werden. Bei den Signalen mit einer Elutionszeit kleiner 3 min handelt es sich zum einen um Artefakte der verwendeten Messmethode¹⁴⁷ zum anderen um Peaks, die aus der Pufferlösung stammen. Vor der Aufnahme des Chromatogramms wird der Lösung ein interner Standard (IS, „Tracer“) zugesetzt (bei diesen Untersuchungen wurde Acetanilid verwendet). Durch Vergleich dieser Lösung mit einer Eichlösung bekannter Konzentration kann die Menge an eluiertem Kreatinin quantifiziert werden.²⁰⁶⁻²⁰⁸

Nach dieser Methode wird für die Konzentration des Eluats ein Wert von $c = 3.3 \times 10^{-6}$ mol/l erhalten, was einer relativ geringen Wiederfindungsrate (32 %) des eingesetzten Kreatinins entspricht. Offensichtlich reichen die polyvalenten

Bindungsstellen in dem funktionalisierten Polymer **84** nicht aus, um eine quantitative Bindung des Kreatinins im micromolaren Bereich zu gewährleisten.

4 Künstliche Rezeptoren zur Erkennung von β -Faltblattstrukturen in Peptiden

4.1 Einführung

Die biologischen Funktionen von Proteinen werden neben der Reihenfolge der Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren vor allem durch die sich ausbildende dreidimensionale Struktur bestimmt.¹⁻³ Die sehr komplexe Gesamtstruktur dieser Polypeptide lässt sich durch einfachere Elemente wie α -Helices, β -Faltblätter („ β -sheets“), „Turns“ oder „Loops“ beschreiben. Neben einer Vielzahl nicht-kovalenter Interaktionen, wie elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen, sind vor allem Wasserstoff-Brücken zwischen den Amidbindungen des Polypeptid-Rückgrates an deren Aufbau beteiligt. Sowohl in α -Helices als auch in „ β -sheets“ bilden sich durch diese H-Brücken regelmäßige, sich wiederholende Sekundärstrukturen aus.²⁰⁹

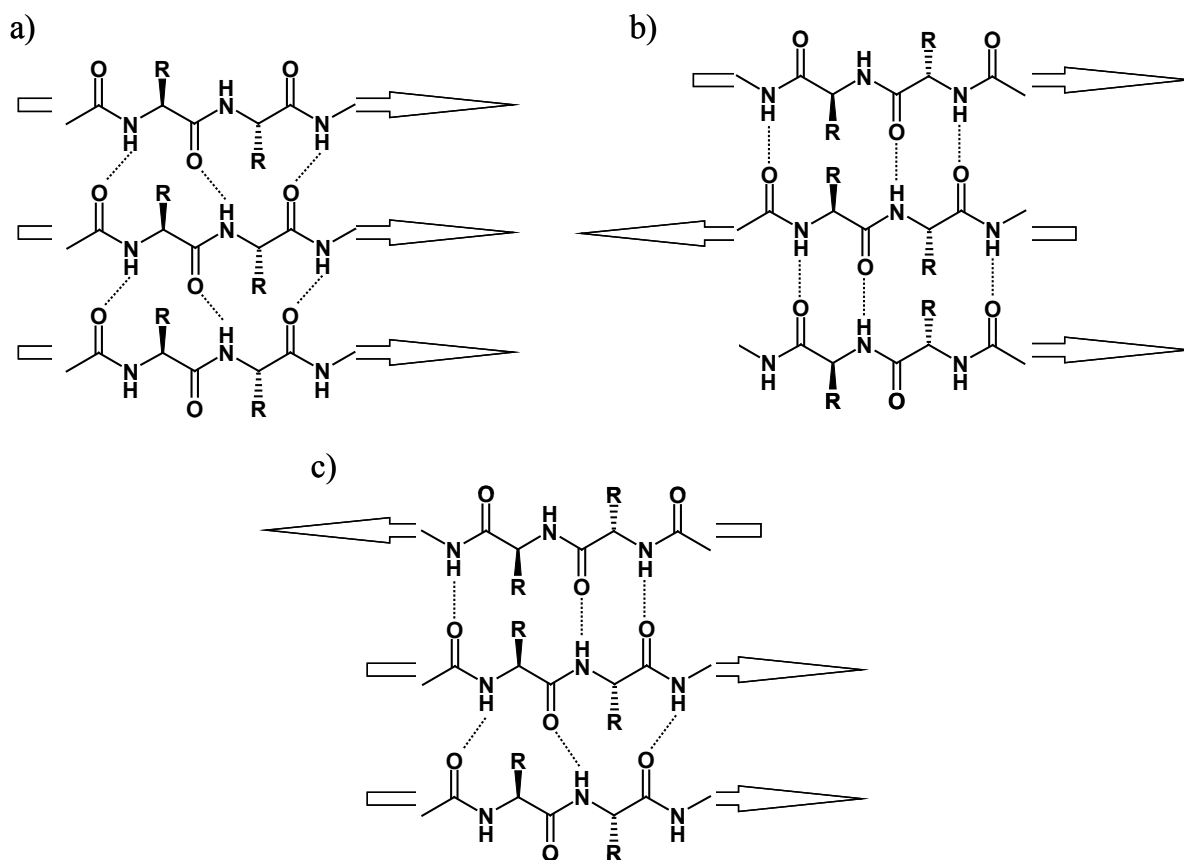


Abb. 48: Schematische Darstellung einer a) parallelen, b) antiparallelen und c) gemischten β -Faltblattstruktur.

In parallelen β -Faltblattstrukturen beispielsweise werden durch zwei gleichsinnig laufende Peptidstränge Wasserstoffbrücken-gebundene Zwölfringe gebildet (Abbildung 48a), wohingegen im antiparallelen Struktur-Typ abwechselnd Zehn- und Vierzehnringe zwischen den Peptidsträngen geformt werden (Abbildung 48b). Die dritte Art der gemischten β -Faltblätter wird in Peptiden seltener beobachtet (Abbildung 48c).

Eine Reihe pathologischer Prozesse ist eng mit der Entstehung derartiger β -Faltblattstrukturen und einer anschließenden Proteinaggregation verbunden. So lagern sich bei der Alzheimererkrankung „ β -sheet“-enthaltende Konglomerate, sogenannte β -Amyloide, in Form von Fibrillen im Gehirn ab.²¹⁰⁻²¹³ Die Umwandlung von α -Helices zu größeren β -Faltblattkomplexen ist charakteristisch für die Creutzfeldt-Jakob Krankheit, BSE („bovine spongiform encephalopathy“) und andere Prionenerkrankungen.²¹⁴⁻²¹⁷

Liganden, welche die Ausbildung und Aggregation von β -Faltblattstrukturen regulieren, verlangsamen oder ganz verhindern können, bieten die Möglichkeit, neue therapeutische Strategien zur Behandlung dieser Krankheiten zu entwickeln. Ein Ansatz, der unter anderem von der Arbeitsgruppe um *Nowick* verfolgt wird, ist das Design künstlicher β -Faltblattstrukturen.^{218,219} Die von ihnen dargestellten Mimetika sind aus zwei unterschiedlichen molekularen Templaten, einem β -Turn- und einem β -Strang-Mimetikum sowie einem oder mehrerer Peptid-Stränge aufgebaut (Abbildung 49). Mittels der verwendeten Template werden β -Faltblattstrukturen in dem angeknüpften Peptid bzw. in den angeknüpften Peptiden induziert.²²⁰⁻²²³ Als Grundgerüst (β -Turn-Mimetikum) dienen *N, N*-verknüpfte Oligo-Harnstoff-Derivate, welche die angebundenen Peptidstränge in räumliche Nähe zueinander bringen sollen. Die Wasserstoff-Brückenbindungsfunktionalitäten werden mittels substituierter Aromaten (β -Strang-Mimetikum) nachgeahmt. Hierbei finden intramolekulare Wechselwirkungen statt.

Fünfring-Heteroaromaten können, neben der bereits besprochenen Erkennung von dDNS, ebenfalls zur selektiven Bindung an β -Faltblattstrukturen in Peptiden eingesetzt werden. Die erste intermolekulare Stabilisierung eines „ β -sheets“ mittels des 3-Aminopyrazols wurde 1996 von *Schrader* und *Kirsten* veröffentlicht.^{225,226} Durch NMR-Titrations und Kraftfeldrechnungen konnten sie zeigen, dass *N/C*-geschützte Dipeptide zunächst von der Oberseite durch drei und anschließend von der Unterseite durch zwei Wasserstoffbrücken gebunden werden. Dieser Erkennungsprozess fixiert das Peptid in der thermodynamisch günstigeren β -Faltblattstruktur (Abbildung 51).

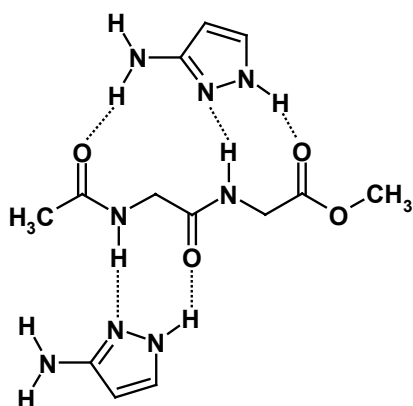


Abb. 51: 2:1-Komplex zwischen 3-Aminopyrazol und *N/C*-geschützten Dipeptiden. Die Oberseite des Peptides bildet drei H-Brücken mit dem Rezeptor-Molekül aus, auf der Unterseite des Peptides werden zwei H-Brücken gebildet (exemplarisch sei hier ein *N/C*-geschützten dimeres Glycin abgebildet).

Mittels verschiedener acylierter 3-Aminopyrazole erreichen sie dabei Bindungskonstanten von 880 M^{-1} in Chloroform. Neben den Substituenten des Rezeptors hängt die Stärke der Bindung dabei jedoch stark vom Grad der Vororientierung des verwendeten Dipeptides ab. Aminosäuren mit sterisch anspruchsvollen Resten, wie beispielsweise Valin, zeigen im Vergleich zum Glycin eine größere Tendenz zur Ausbildung von β -Faltblattstrukturen.²²⁷ Dementsprechend wird für die Bindung eines Pyrazols an Ac-Val-Val-OMe eine etwa um den Faktor drei höhere Bindungskonstante im Vergleich zur Bindung eines analogen Rezeptors an Ac-Gly-Val-OMe erhalten.²²⁶

4.2 Problemstellung und Konzeption

Im Folgenden Teil dieser Arbeit soll nun, basierend auf den oben beschriebenen Arbeiten von *Schrader* und Mitarbeitern, das im Falle der DNS so erfolgreiche Konzept heteroaromatischer Oligoamide²²⁸ zur molekularen Erkennung kleiner Peptide und Peptidstrukturen genutzt werden. Unser Ansatz basiert dabei auf der Annahme, dass die Assoziationskonstante zwischen Ligand und Rezeptor deutlich ansteigt, wenn sich anstelle des monomeren Aminopyrazols Di- oder Trimere auf beiden Seiten größerer Peptide anordnen. Dies lässt sich durch die Kupplung von künstlichen Pyrazolaminosäuren verwirklichen. Dabei ist zu beachten, dass die verknüpften Pyrazole und das Peptid im Hinblick auf die Abfolge von Donoren (D) und Akzeptoren (A) für eine ideale Bindung ein komplementäres Bindungsmuster aufweisen müssen (Abbildung 52a).

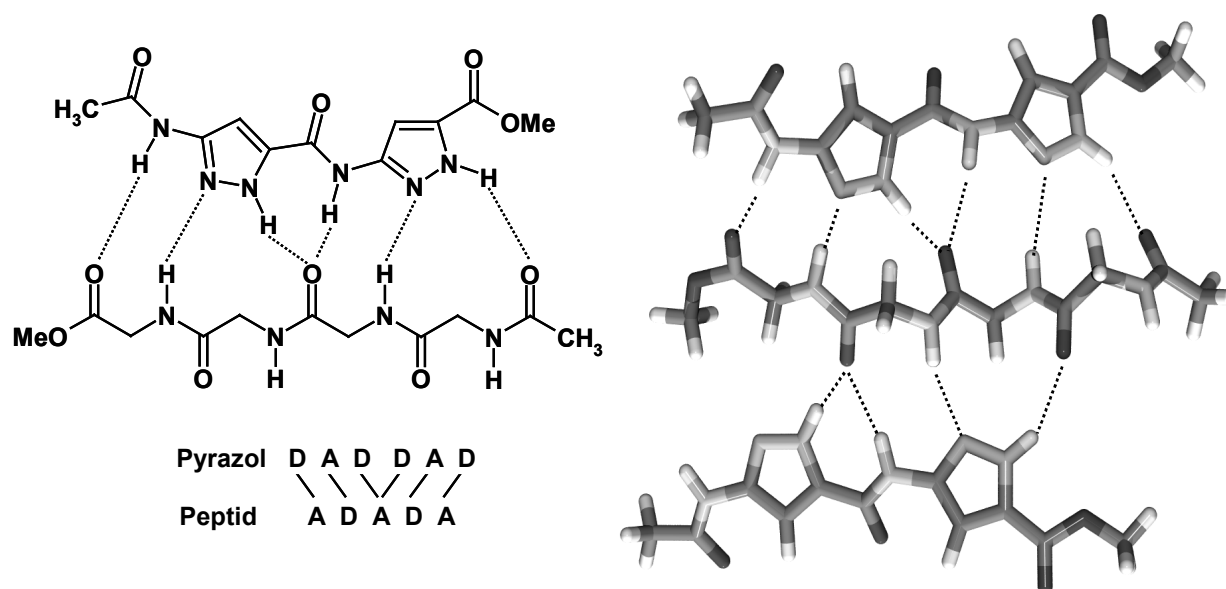


Abb. 52: a) mögliches Bindungsmuster zwischen einer dimeren Pyrazolaminosäure mit 3, 5-Substitutionsmuster (am C-Terminus als Methylester geschützt, am N-Terminus acetyliert) und einem *N/C*-geschützten tetrameren Glycin (auf ein zweites Rezeptor-Molekül, welches – wie in 52 b dargestellt – gleichzeitig an die Unterseite des Peptides binden kann, sei aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet); b) semiempirisch auf PM3-Niveau berechnete Molekülgeometrie eines 2:1 Pyrazol/Peptid-Komplexes (die gestrichelten Linien symbolisieren die theoretisch möglichen Wasserstoffbrücken zwischen dem Peptid und den Pyrazol-Oligoamiden).

Wie von uns durchgeführte theoretische Berechnungen zeigen,²²⁹ müssen die beiden Funktionalitäten der monomeren Aminosäure in 3,5-Stellung zueinander angeordnet

sein, um diese optimale Anordnung in den Dimeren bzw. höheren Homologen zu gewährleisten (Abbildung 52b).

Neben der direkten Verknüpfung der heteroaromatischen Bausteine wird der Einbau natürlicher Aminosäuren in die Oligoamidsequenz angestrebt. Dieses Vorgehen hat mehrere Gründe. Zum einen soll dadurch die Flexibilität der länger werdenden Kette aufrecht erhalten werden, um eventuell auftretende Geometrieunterschiede zwischen Substrat und Rezeptor zu vermeiden. Zum anderen soll durch den Einbau chiraler Aminosäuren mit sterischem Anspruch (beispielsweise Valin) eine ideale Vororientierung der Rezeptoren für eine mögliche Bindung an β -Faltblattstrukturen gewährleistet werden. Ferner soll die Alternanz künstlicher und natürlichen Aminosäuren die Löslichkeit der neuen Rezeptor-Moleküle in organischen Solventien aufrecht erhalten.

Durch die Aufnahme zweidimensionaler NMR-Spektren (COSY, ROESY) werden Hinweise auf mögliche Konformationen der dargestellten Strukturen erwartet. Die Bindungseigenschaften der Zielmoleküle an geeignete Peptidstränge sollen mittels NMR-Titration sowie CD-spektroskopischen Methoden untersucht werden.

4.3 Darstellung von Pyrazol-Oligoamiden aus monomeren Bausteinen mit freiem Ringstickstoff

4.3.1 Versuch der Synthese in Lösung

Pyrazol tritt infolge eines Protonen-Austausches zwischen den beiden benachbarten Ringstickstoffen in zwei identischen tautomeren Formen auf.²³⁰⁻²³² Im Falle des 3(5)-Aminopyrazols kann bis zum heutigen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt werden, welches der beiden Tautomere überwiegend vorliegt.

3, 5-substituierte Pyrazole mit freiem Ringstickstoff unterliegen ebenfalls dieser annularen Tautomerie (Prototopie), weshalb nicht zwischen den Positionen drei und fünf unterschieden werden kann (Abbildung 53).²³⁰⁻²³² Als eine weitere Konsequenz dieser Prototopie können für die künstlichen Pyrazolaminosäuren zwei unterschiedliche Bindungsmuster formuliert werden. Zur Bindung an Peptidsequenzen ist allerdings nur das 3-Aminopyrazol-5-carbonsäure-Tautomer mit DAD-Motiv befähigt.²²⁶ Dieses Erkenntnis lässt darauf schließen, dass das Gleichgewicht bei der Komplexbildung auf die Seite dieses „bindenden“ Tautomers verschoben wird. In dieser Arbeit soll deshalb

bei Pyrazol-Derivaten mit freiem Ringstickstoff nur das entsprechende 3-Amino-5-carbonsäure-Derivat angegeben werden.

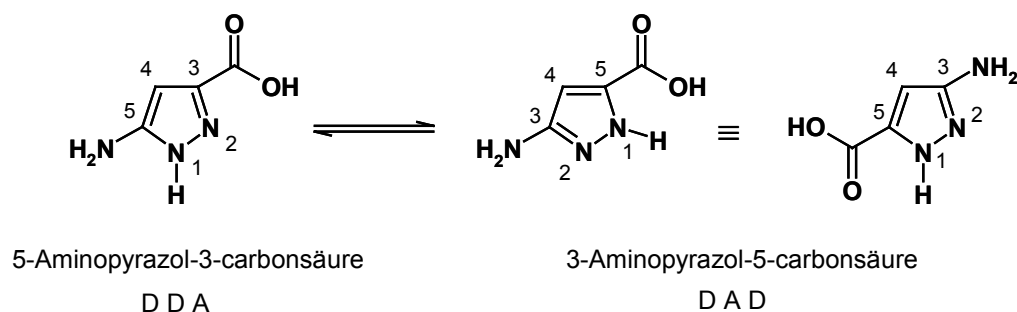


Abb. 53: Annulare Tautomerie bei 3,5-substituierten Pyrazolen mit freiem Ringstickstoff und das daraus resultierende Wasserstoffbrückenbindungsmuster (D: Donor, A: Akzeptor).

Der Aufbau des gewünschten Zielmoleküls ist, retrosynthetisch betrachtet, durch die Reaktion eines Hydrazins mit einem Derivat des Cyanopyruvates denkbar (Abbildung 54). Wird letztere Verbindung als entsprechender Ester (R = Me oder Et) eingesetzt, könnte direkt der erste kupplungsfähige Baustein erhalten werden (Abbildung 54, I). Nachfolgende Schützung der exocyclischen Amino-Funktion mit einer bezüglich der Carboxy-Funktion orthogonalen Schutzgruppe und anschließende Verseifung des Esters sollte den zweiten Kuplungspartner liefern (Abbildung 54, II).

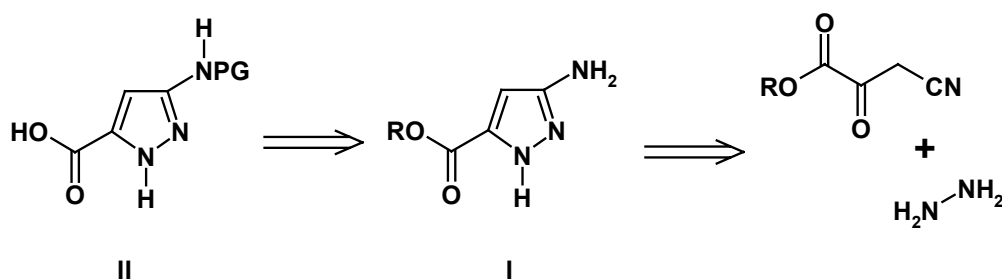


Abb. 54: Retrosynthese einer nicht-natürlichen Pyrazolaminosäure mit 3, 5-Substitutionsmuster.

Im Folgenden soll nun dieser retrosynthetische Ansatz zum Aufbau der künstlichen Aminosäure verfolgt werden. Im ersten Schritt wird in einer literaturbekannten Synthese das Kaliumsalz des Ethylcyanopyruvates **88** dargestellt (Abbildung 55).²³³ Nach Zugabe von Acetonitril zu einer Lösung von Oxalsäurediethylester und Kalium in Ethanol/Diethylether fällt Verbindung **88** in Form eines gelblichen Feststoffs aus. Nach

Absaugen und Trocknen des Rückstandes im Hochvakuum wird **88** in quantitativer Ausbeute erhalten.

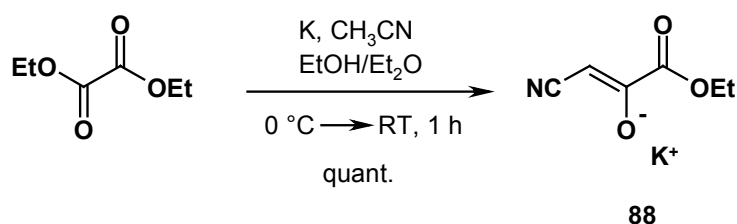


Abb. 55: Darstellung der Verbindung **88**.

Bei dem anschließenden Versuch, **88** direkt mit Hydrazin-Hydrat unter Säurekatalyse umzusetzen, konnte kein Produkt isoliert werden. Aus diesem Grund wird der geschützte Hydrazinoameisensäuremethylester eingesetzt. Reaktion mit **88** in Chloroform unter Zugabe von Chlorwasserstoff-gesättigtem EE und nachfolgende säulenchromatographische Reinigung liefert das offenkettige Kondensationsprodukt **89** in Form eines farblosen Feststoffs in 39 %iger Ausbeute (Abbildung 56). Durch anschließende basenkatalysierte Umsetzung dieser Verbindung in Acetonitril wird das heterocyclische Pyrazol-Derivat **90** erhalten (Abbildung 56). Die Aufreinigung des Rohproduktes gelingt durch Umkristallisation aus EE (farblose Kristall-Nadeln, 98 % Ausbeute).

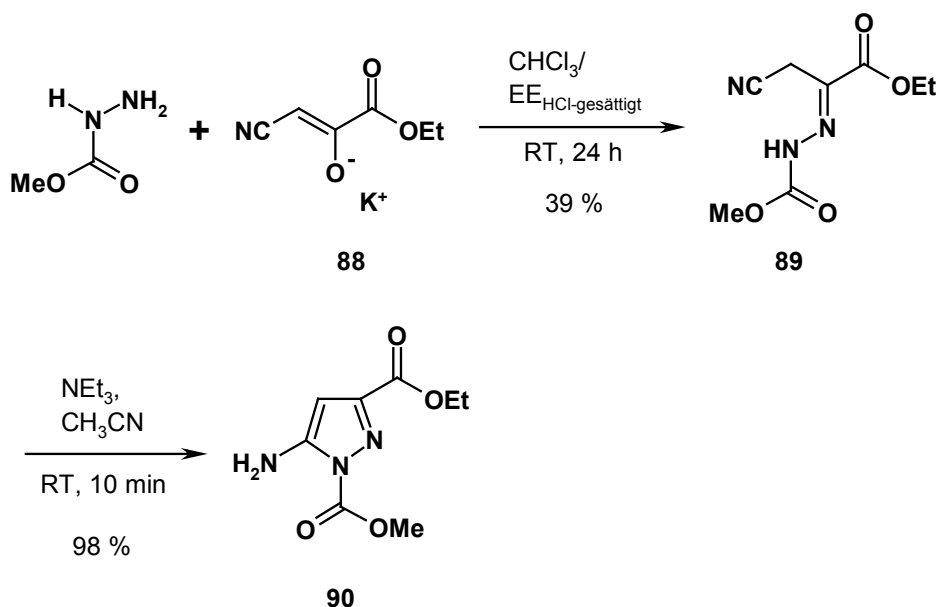


Abb. 56: Darstellung der Verbindung **89** und nachfolgende Cyclisierung zum Derivat **90**.

Das Grundgerüst einer künstlichen Pyrazolaminosäure konnte demnach mittels einer dreistufigen Synthese in einer Gesamtausbeute von 79 % aufgebaut werden.

Die bei dem Derivat **89** mögliche *cis*-/*trans*-Isomerie konnte NMR-spektroskopisch nicht beobachtet werden. Offensichtlich wandeln sich die beiden Isomere in dem verwendeten organischen Lösungsmittel schnell ineinander um, so dass im Rahmen der NMR-Zeitskala nur ein Gleichgewichtszustand detektiert werden kann. Dieses Phänomen wird in vergleichbaren literaturbeschriebenen Verbindungen ebenfalls beobachtet.^{234,235} Eine genaue Untersuchung der Konformation ist hier aber nur von untergeordnetem Interesse, da die Verbindung, wie oben bereits erwähnt, im nächsten Schritt zum entsprechenden Fünfring cyclisiert wird.

Das in Abbildung 56 dargestellte 3,5-Substitutionsmuster dieser nicht-natürlichen Pyrazolaminosäure **90** konnte röntgenstrukturanalytisch verifiziert werden. Die Verbindung kristallisiert in der triklinischen Raumgruppe P1 (Abbildung 57).²³⁶

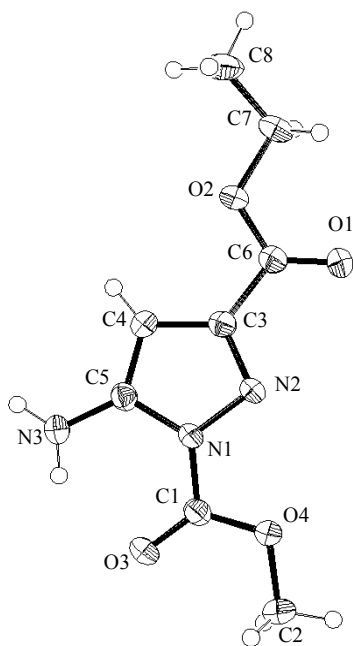


Abb. 57: Kristallstruktur der Verbindung **90**.

Zur nachfolgenden Darstellung eines dimeren Pyrazolamides, kann als Aminkomponente direkt das am C-Terminus geschützte Derivat **90** eingesetzt werden. Im Anschluss an eine erfolgreiche Kupplung müsste dann abschließend die Carbamat-Schutzgruppe entfernt werden.

Die ferner benötigte N-terminal geschützte Aminosäure lässt sich durch die Umsetzung des Heterocyclus **90** mit Fmoc-Cl darstellen. Durch das während der Reaktion frei

werdende HCl wird gleichzeitig die Schutzgruppe am Ringstickstoff abgespalten, wodurch das *N/C*-terminal geschützte Derivat **91** in 96 %iger Ausbeute (farbloser Feststoff) erhalten wird (Abbildung 58). Nachfolgende Umsetzung von **91** in einer Mischung aus halbkonzentrierter HCl, Essigsäure und Ethanol liefert die künstliche Pyrazolaminosäure **92** mit freiem C-Terminus in Form eines farblosen Feststoffs in 91 % Ausbeute.

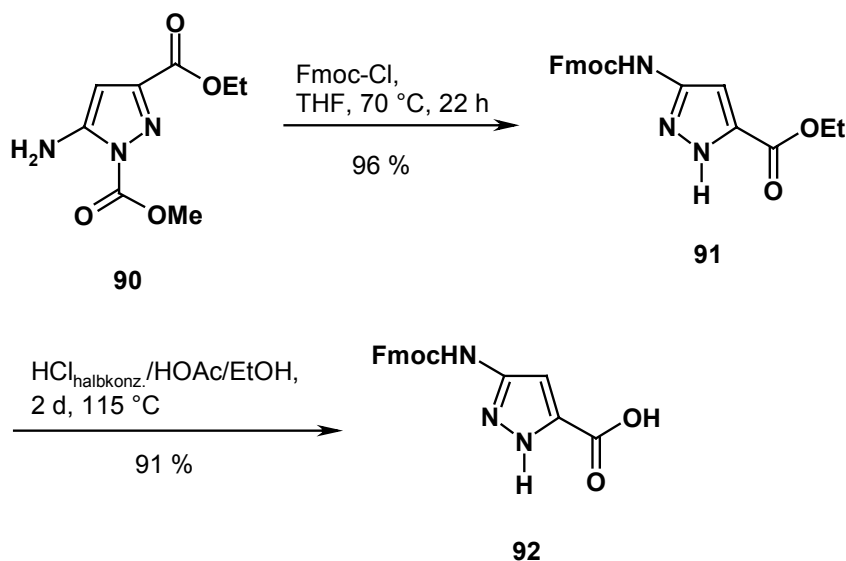


Abb. 58: Darstellung der geschützten Aminosäure **91** und anschließende Entschützung des C-Terminus.

Bei der nachfolgenden Kupplung der beiden Bausteine **90** und **92** konnten keine dimeren Struktur motive isoliert werden. Auf die durchgeführten Reaktionen soll im Folgenden dennoch kurz eingegangen werden.

Eine Strategie bestand in der Kupplung des heterocyclischen Säurechlorids, welches aus **92** *in situ* durch Umsetzung in Thionylchlorid unter DMF-Katalyse erhalten wird, mit dem Amin **90** ohne Zusatz einer Base (Abbildung 59, Weg a). Dadurch sollte eine Reaktionsführung bei höheren Temperaturen ermöglicht werden. Es wurden Ansätze bei variabler Temperatur (25 °C bis 70 °C) und variabler Reaktionszeit (5 h bis 2 d) durchgeführt, bei denen zum einen das Amin, zum anderen das Säurechlorid als Überschusskomponente (jeweils 1.1 eq bis 1.3 eq) eingesetzt wurde. Bei letzteren Reaktionen sollte, in Analogie zur Darstellung von Verbindung **91** (siehe Abbildung 58), infolge der Abspaltung der Schutzgruppe am Pyrazol-Ringstickstoff, das Gleichgewicht auf die Seite des Produktes verschoben werden.

Der parallel durchgeführte Ansatz, bei dem durch den Zusatz einer Base ein möglicher Abbruch der Reaktion – Protonierung desamins **90** – verhindert werden sollte, führte ebenso wenig zum Ziel (Abbildung 59, Weg b).

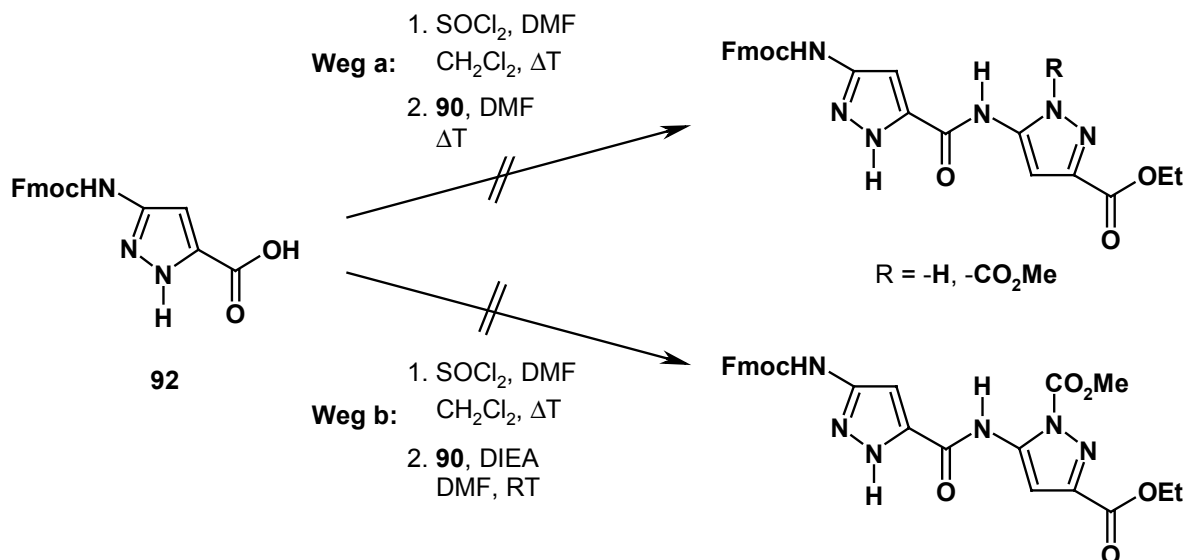


Abb. 59: Versuch der Darstellung *N/C*-terminal geschützter Pyrazolaminosäure-Dimere.

Ein möglicher Grund für das Scheitern dieser Reaktionen könnte eine zu geringe Nukleophilie der heterocyclischen Aminofunktion von **90** sein. Hinweise darauf lieferte die bereits besprochene Schützung dieser Verbindung (siehe Abbildung 58). Hierbei konnte, im Gegensatz zu literaturbeschriebenen Umsetzungen von Aminen mit Fmoc-Cl,²³⁷ nur bei einer Temperaturerhöhung und vergleichsweise langen Reaktionszeiten vollständiger Umsatz erhalten werden. Des Weiteren wird bei stickstoffhaltigen Fünfring-Heteroaromaten, wie beispielsweise der *N*-Methyl-Imidazolaminosäure, eine verringerte Carbonyl-Aktivität beobachtet.^{119,120} Diese Eigenschaften könnten eine erfolgreiche Kupplung von **90** mit **92** verhindern.

Als Lösungsansatz wurde im Folgenden die Anknüpfung einer oder zweier aliphatischer Aminosäuren an den *N*-Terminus des Heterocyclus **90** verfolgt. Dadurch würde das Problem einer möglichen verringerten Nukleophilie der exocyclischen Aminofunktion umgangen und die anschließende Kupplung mit einer weiteren nicht-natürlichen Pyrazolaminosäure **92** könnte gelingen. Computerberechnungen mit dem Tetramer Ac-Pz(*H*)-Gly-Gly-Pz(*H*)-OEt deuten zudem darauf hin, dass eine derartige Verbindung ein ideales Bindungsmuster im Hinblick auf eine Interaktion mit β -Faltblattstrukturen aufweisen müsste (Abbildung 60).²²⁹

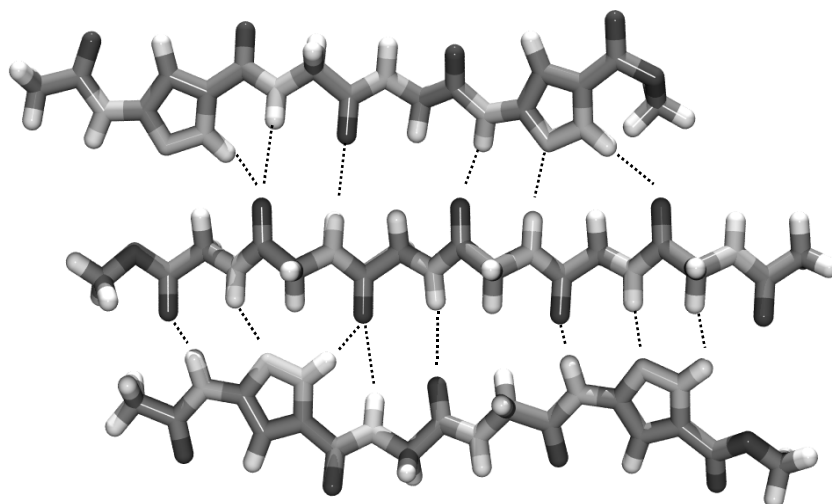


Abb. 60: Semiempirisch auf PM3-Niveau berechnete Molekülgeometrie eines Komplexes zwischen einem *N/C*-terminal geschützten hexameren Glycin und Ac-Pz(*H*)-Gly-Gly-Pz(*H*)-OMe (die gestrichelten Linien symbolisieren die theoretisch möglichen Wasserstoffbrücken zwischen dem Peptid und den Pyrazol-Oligoamiden).

In Analogie zu oben besprochener Synthese (siehe Abbildung 58) ist Verbindung **93** (farbloser Feststoff, 97 % Ausbeute) durch Umsetzung von **90** mit Fmoc-Gly-Cl darstellbar (Abbildung 61). Letzteres wird aus der käuflichen *N*-terminal geschützten Aminosäure in einer literaturbekannten Vorschrift durch Reaktion mit Thionylchlorid erhalten.²³⁷ Abspaltung der Schutzgruppe mit Piperidin in DMF liefert das Derivat H-Gly-Pz(*H*)-OEt **94** in 93 %iger Ausbeute in Form eines farblosen Feststoffs. Die Verlängerung der Sequenz um eine weitere Glycin-Einheit gelingt durch Umsetzung von **94** in DMF unter Zusatz einer Base (**95**, farbloser Feststoff, 41 % Ausbeute). Nach Entfernen der Fmoc-Gruppe wird das am *C*-Terminus geschützte Trimer **96** in 98 %iger Ausbeute (farbloses Pulver) isoliert (Abbildung 61).

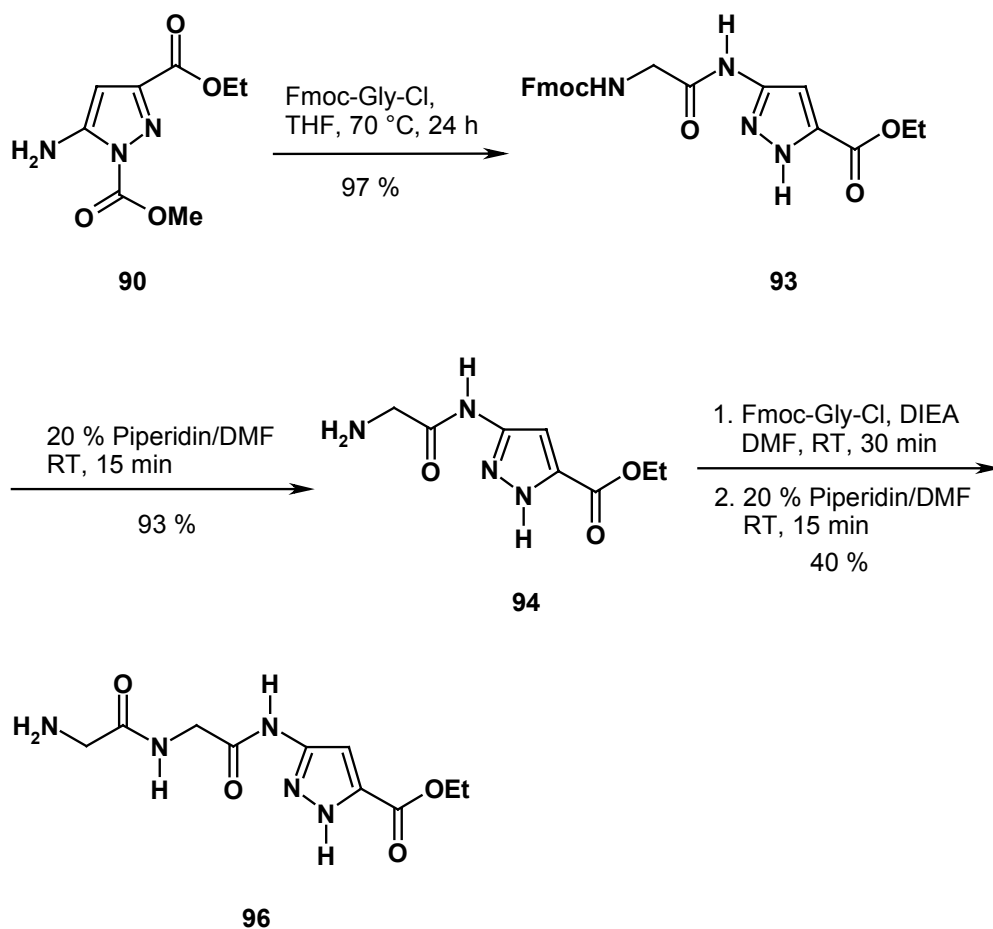


Abb. 61: Darstellung der C-terminal geschützten Pyrazolaminosäure-Derivate **93**, **94** und **96**.

Die nachfolgende Kupplung des Trimers **96** mit dem Säurechlorid von **92** lieferte jedoch auch hier nicht das gewünschte Produkt. Vielmehr konnte unter den angewandten Reaktionsbedingungen eine Übertragung der Fmoc-Schutzgruppe beobachtet werden (Abbildung 62). Neben nicht umgesetztem Edukt **92** (33 % Ausbeute) wurde die *N/C*-terminal geschützte Verbindung **97** in 18 %iger Ausbeute (leicht gelblicher Feststoff) isoliert.

Eine alternative Verknüpfung der beiden Bausteine **92** und **96** unter Verwendung von Peptidkupplungsreagenzien ist nicht möglich. Wie von uns durchgeführte Arbeiten gezeigt haben, führt eine Umsetzung von Pyrazolbausteinen mit freiem Ringsstickstoff unter diesen Bedingungen stets zur Reaktion der Säurekomponente mit dem cyclischen NH.²³⁸ Eine mögliche Erklärung dieser Selektivität liefert das 1963 von *Pearson* eingeführte HSAB-Prinzip, wonach „harte“ Säuren bevorzugt mit „harten“ Basen und „weiche“ Säuren bevorzugt mit „weichen“ Basen reagieren.²³⁹

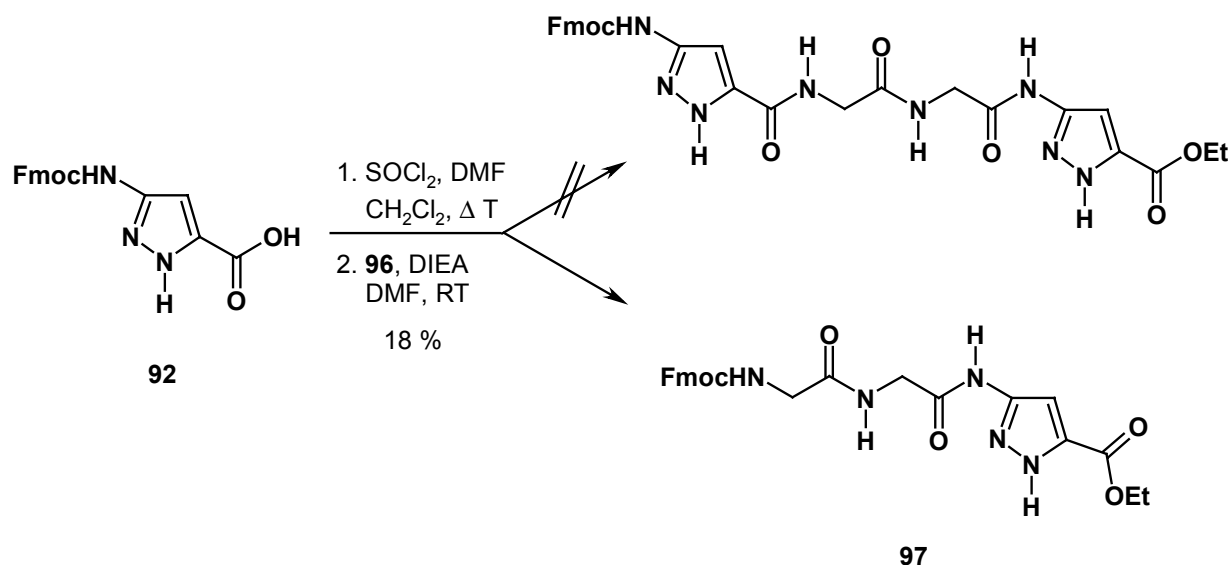


Abb. 62: Versuch der Darstellung eines *N/C*-terminal geschützten Tetrapeptids.

Die exocyclische Amino-Funktion der künstlichen Pyrazolaminosäure kann aufgrund der hohen lokalen Ladungskonzentration und der damit einhergehenden niedrigen Polarisierbarkeit des Stickstoffs als „harte“ Base aufgefasst werden. Demgegenüber weist die cyclische NH-Gruppe, die sich in einem konjugierten aromatischen System befindet, eine hohe Polarisierbarkeit (niedrige lokale Ladungskonzentration) auf, was einen „weichen“ Charakter dieses Ringstickstoffs zur Folge hat. Somit reagieren die, nach obigem Prinzip als „hart“ eingestuften Säurechloride bevorzugt mit der exocyclischen NH₂-Gruppe, wohingegen die „weichen“ Aktivester, die unter Peptidkupplungsbedingungen gebildet werden, selektiv den Ringstickstoff angreifen.

4.3.2 „Liquid Phase“ Synthese von Pyrazol-Oligoamiden an Polyethylenglycol Monomethylether als Trägermaterial

Eine Möglichkeit der schutzgruppenfreien Synthese von heteroaromatischen Oligoamiden besteht in der Verwendung von löslichen Polymerharzen als Trägermaterialien.²⁴⁰ Im Gegensatz zu der bereits besprochenen Festphasensynthese nach *Merrifield* (siehe Kapitel 1.1.3) erfolgt die Darstellung der Zielmoleküle hierbei unter homogenen Reaktionsbedingungen. Durch die Löslichkeit des Trägermaterials in gängigen organischen Solventien lassen sich die einzelnen Kupplungsschritte direkt, ohne Abspaltung der jeweiligen Sequenz vom Polymer, mittels NMR-spektroskopischer Methoden untersuchen. Die Aufreinigung der polymergebundenen Produkte kann nach

beendeter Reaktion durch Dialyse, Ultrazentrifugation oder Ausfällen infolge der Zugabe eines Lösungsmittels erfolgen.

Wie in unserem Arbeitskreis erstmals gezeigt werden konnte, können künstliche *N*-Methylpyrrol- und *N*-Methylimidazol-Oligoamide an Polyethylenglycol Monomethylether (MeO-PEG-OH, mittlere Molmasse 5000) aufgebaut werden.^{136,177,241}

Die endständige Methoxygruppe dient als interner Standard für die Reaktionskontrolle mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie. Als monomere Bausteine kommen dabei geeignete Nitrocarbonsäure-Derivate zum Einsatz, die über die entsprechenden Säurechloride auf dem Polymer immobilisiert werden. Die Anknüpfung eines weiteren Bausteins erfolgt nach Reduktion der Nitro-Gruppe zum einen mit Hilfe von Peptidkupplungsreagenzien zum anderen unter Verwendung der Säurechloride.

Im Folgenden soll eine analoge Methodik zur schutzgruppenfreien Darstellung oligomerer Pyrazolaminosäuren entwickelt werden.

Im ersten Schritt der Synthese wird ausgehend von der käuflichen 3-Nitropyrazol-5-carbonsäure das entsprechende Säurechlorid dargestellt. Umsetzung in Thionylchlorid unter Zugabe katalytischer Mengen DMF liefert Verbindung **98** in 94 %iger Ausbeute (gelber Feststoff). Zur Immobilisierung dieses Bausteins auf dem löslichen Polymerharz wird **98** (2 eq) in DMF gelöst und unter Rühren in eine Lösung von MeO-PEG-OH und Pyridin in CH₂Cl₂ getropft (Abbildung 63). Zur Aufreinigung wird das polymergebundene Produkt **99** durch Zugabe von Diethylether ausgefällt und über einen Büchnertrichter abgesaugt. Die vollständige Abtrennung sowohl des Pyridins als auch des überschüssigen Säurechlorids gelingt durch Lösen des erhaltenen Feststoffs in CH₂Cl₂ und erneutes Ausfällen mit Diethylether. Verbindung **99** wird als farbloses Pulver isoliert. ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchung zeigt eine quantitative Belegung des Trägermaterials.

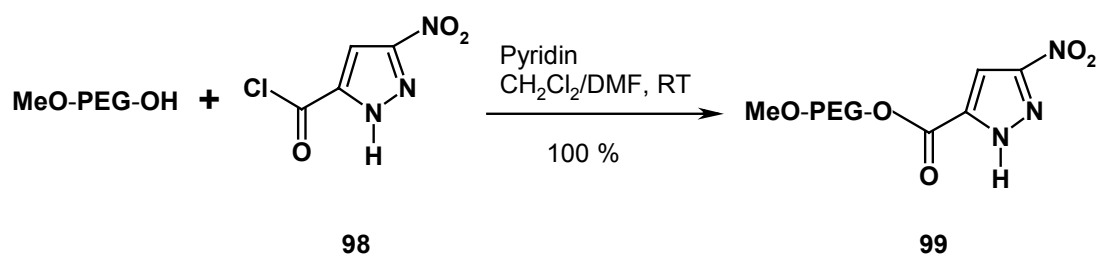


Abb. 63: Anknüpfung des ersten Pyrazolbausteins an MeO-PEG-OH.

Als nächster Schritt schließt sich die Reduktion der heteroaromatischen Nitrogruppe am Trägermaterial an. Dazu wird **99** in Methanol suspendiert und durch Zugabe von

CH_2Cl_2 vollständig gelöst. Transferhydrierung mit Ammoniumformiat und Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd) liefert nach bereits beschriebener Aufarbeitung das Amin **100** in Form eines farblosen Pulvers (Abbildung 64). Die Vollständigkeit der Reduktion wird mittels ^1H -NMR-Spektroskopie verifiziert.

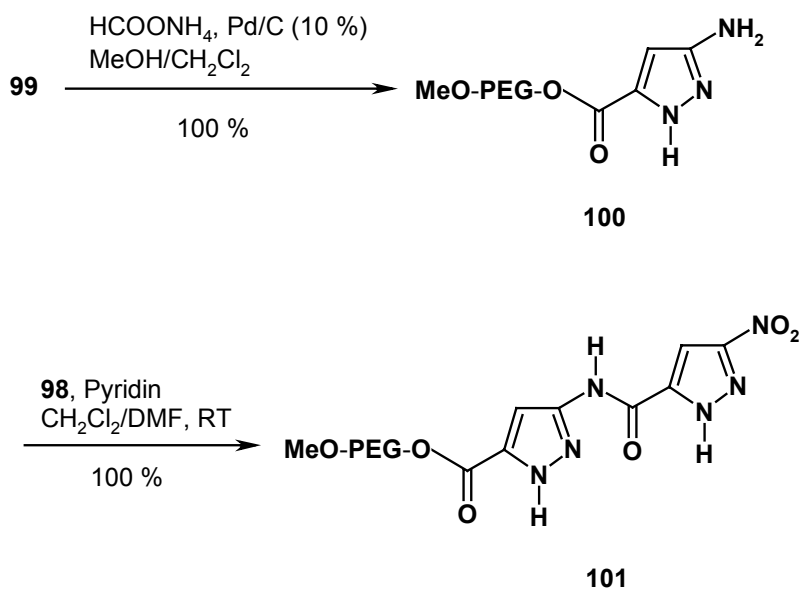


Abb. 64: Reduktion der Nitrogruppe des polymergebundenen Pyrazolbausteins und Anknüpfung einer weitem künstlichen Aminosäure.

Die Anknüpfung eines weiteren monomeren Bausteins und die anschließende Aufreinigung erfolgt analog zu bereits Beschriebenem, wodurch Verbindung **101** in Form eines farblosen Pulvers erhalten wird (Abbildung 64). Die Belegung des Trägermaterials ist auch hier quantitativ.

Zur Abspaltung der dimeren Pyrazolaminosäure wird die Verbindung **101** in 2 N NaOH gelöst und nach beendeter Reaktion mit EE extrahiert. Nach Umkristallisation des Rohproduktes in EE wird Verbindung **102** in 85 %iger Ausbeute (farbloser Feststoff) erhalten (Abbildung 65).

Ausgehend von dem leicht zugänglichen 3-Nitropyrazol-5-carbonsäurechlorid **98** konnte eine dimere Pyrazolaminosäure mit einer Gesamt-Ausbeute von 85 % über vier Stufen dargestellt werden. Die einzelnen Arbeitsschritte sind äußerst effizient, die Aufreinigung der Zwischenprodukte gelingt durch einfaches Ausfällen mit Diethylether.

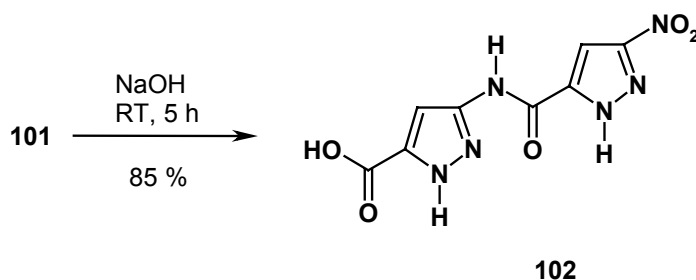


Abb. 65: Abspaltung des Pyrazolaminosäure-Dimers vom Trägermaterial.

Bei dem Versuch, eine dritte Pyrazolaminosäure anzuknüpfen, konnte kein einheitliches Produkt erhalten werden. Dies könnte an der zunehmenden statistischen Konkurrenz-Reaktion zwischen dem freien Ringstickstoff und der NH_2 -Funktion liegen. Aus diesem Grunde soll in den weitergehenden Arbeiten auf diesem Gebiet ein monomerer Bausteine mit geschütztem Ringstickstoff verwendet werden.²⁴² Ein weiteres Problem ist die Abnahme der Belegung des Trägermaterials. Diese Tatsache wurde bereits bei der Synthese längerer *N*-Methylpyrrol- und *N*-Methylimidazol-Oligoamide beobachtet, wobei die Ursachen nicht eindeutig geklärt werden konnten.¹⁷⁷ Ein möglicher Grund könnte die Spaltung des PEG-Esters durch freies Amin sein.

Im Folgenden soll deshalb die Entwicklung eines Festphasenprotokolls zum Aufbau längerer Pyrazol-Oligoamide beschrieben werden.

4.4 Chirale Pyrazol-Oligoamide

4.4.1 Einführung

Vor der Durchführung der Festphasensynthesen wird mittels „*molecular modeling*“ Studien nach Hinweisen auf eventuell geeignete Zielstrukturen gesucht.²²⁹

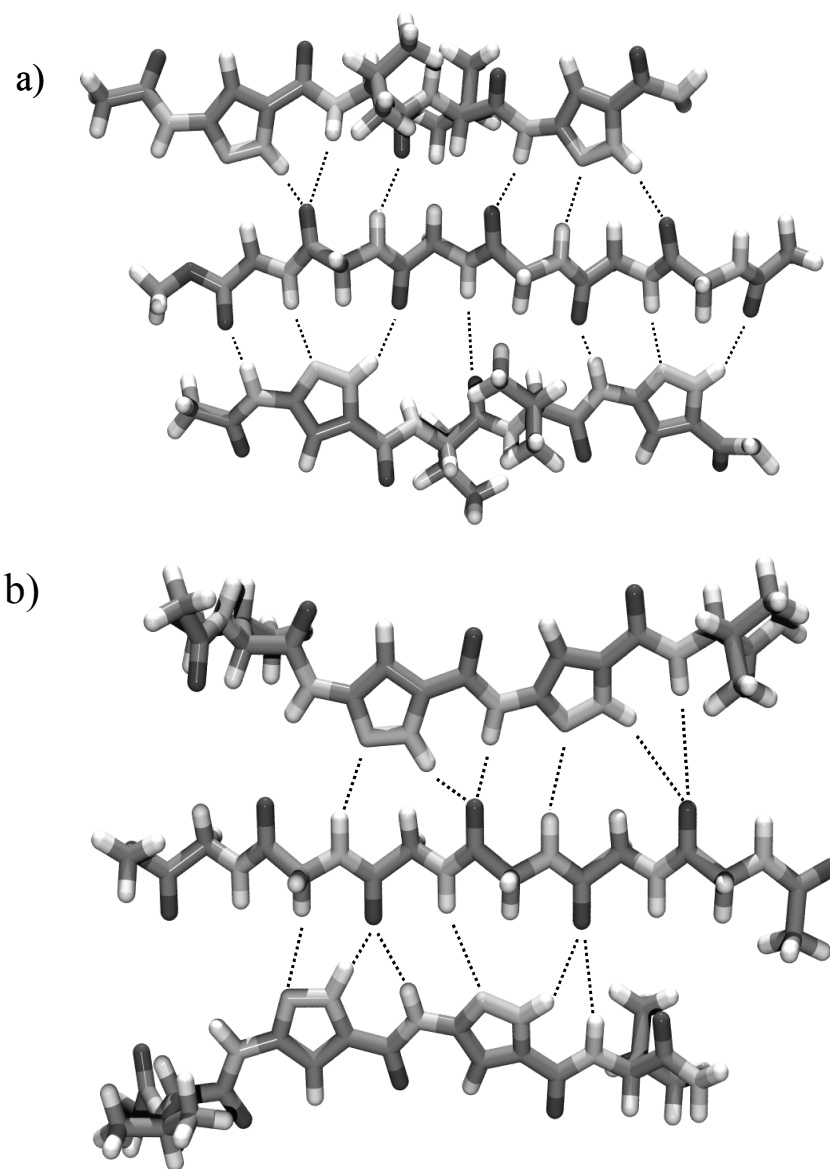


Abb. 66: Semiempirisch auf PM3-Niveau berechnete Molekülgeometrie eines Komplexes zwischen einem *N/C*-terminal geschützten hexameren Glycin und a) Ac-Pz(*H*)-Val-Val-Pz(*H*)-NH₂ (**110**) bzw. b) Ac-Val-Pz(*H*)-Pz(*H*)-Val-NH₂ (**111**; die gestrichelten Linien symbolisieren die theoretisch möglichen Wasserstoffbrücken zwischen dem Peptid und den Pyrazol-Oligoamiden).

Das Augenmerk der Rechnungen soll hierbei vor allem darauf gelegt werden, Geometrien auszuwählen, die eine optimale Anordnung der synthetisierten Oligoamide an das betrachtete Peptid gewährleisten. D.h. unter Berücksichtigung des Aminopyrazol-Bindungsmotivs (siehe Abbildung 51, Kapitel 4.1) soll eine maximale Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Peptid ausgebildet werden.

Die Pyrazol-Bausteine sollen zum einen direkt, zum anderen über das aliphatische *L*-Valin miteinander verknüpft werden. Die Verwendung dieser Aminosäure soll eine ideale Vororientierung der synthetisierten Oligoamide für eine mögliche Bindung an β -Faltblattstrukturen sicherstellen. Abbildung 66 zeigt die aus den Rechnungen erhaltenen Molekülgeometrieen eines Komplexes zwischen einem *N/C*-terminal geschützten hexameren Glycin und den tetrameren Oligoamiden Ac-Pz(*H*)-Val-Val-Pz(*H*)-NH₂ (**110**, Abbildung 66a) bzw. Ac-Val-Pz(*H*)-Pz(*H*)-Val-NH₂ (**111**, Abbildung 66b).

4.4.2 Monomer-Synthese⁶

Vorraussetzung für die Darstellung von Oligoamiden bzw. Peptiden an der Festphase ist die Entwicklung einer effizienten Synthese-Route für den entsprechenden monomeren Baustein. Im Falle der künstlichen Pyrazolaminosäure müssen, aus bereits diskutierten Gründen (siehe Kapitel 4.3.1), sowohl der *N*-Terminus als auch der Ringstickstoff geschützt werden. Hierbei ist eine orthogonale Schutzgruppentaktik notwendig, um eine selektive Deblockierung der *N* ^{α} -Aminofunktion zu gewährleisten.²⁴³ Als Schutzgruppe für das cyclische NH wird das *p*-Methoxybenzyl (pMB) verwendet, das sich in siedender TFA in guten Ausbeuten wieder entfernen lässt.²⁴⁴ Demgegenüber bietet sich für die exocyclische Amino-Gruppe der Einsatz der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe an.

Abbildung 67 zeigt die Synthese, die den kupplungsfähigen Baustein **107** in einer Gesamt-Ausbeute von 45 % über vier Stufen liefert. Ausgehend von der käuflichen 3-Nitropyrazol-5-carbonsäure **103** wird der Methylester **104** durch Umsetzung in Chlorwasserstoff-gesättigtem Methanol in quantitativer Ausbeute (farbloser Feststoff)

⁶ Die Synthese des monomeren Bausteins **106** wurde von Dipl. Chem. Petra Rzepecki am Arbeitskreis von Prof. Dr. T. Schrader (Philips Universität Marburg) entwickelt. Im Rahmen einer Kooperation wurden von beiden Gruppen Pyrazol-Oligoamide synthetisiert und hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften mit geeigneten Peptiden untersucht.

erhalten. Die anschließende Reaktion mit pMB-Chlorid in DMF unter Zusatz von Kaliumcarbonat liefert **105** in Form eines leicht gelblichen Feststoffs in 94 %iger Ausbeute. Abhängig von der jeweiligen Charge wird ein Gemisch der beiden möglichen Tautomere (siehe auch Abbildung 53) in unterschiedlichen Verhältnissen erhalten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und in Analogie zu obiger Vorgehensweise (siehe Kapitel 4.3.1) sei im Folgenden jeweils das Isomer abgebildet, welches nach Abspaltung der Schutzgruppe das „richtige“ Bindungsmuster (DAD) aufweist. Nach Freisetzung der Carbonsäure **106** (farbloser Feststoff, 94 % Ausbeute) mittels Lithiumhydroxid in einem Methanol-Tetrahydrofuran-Wasser-Gemisch wird die Fmoc-Schutzgruppe eingeführt. Dies gelingt durch Reduktion der Nitrogruppe mit Wasserstoff unter Palladium-Katalyse (10 % Pd) und nachfolgender Umsetzung mit Fmoc-Cl und DIEA. Der kupplungsfähige Baustein Fmoc-Pz(pMB)-OH (**107**) wird in Form eines farblosen bis leicht gelben Feststoffs isoliert.

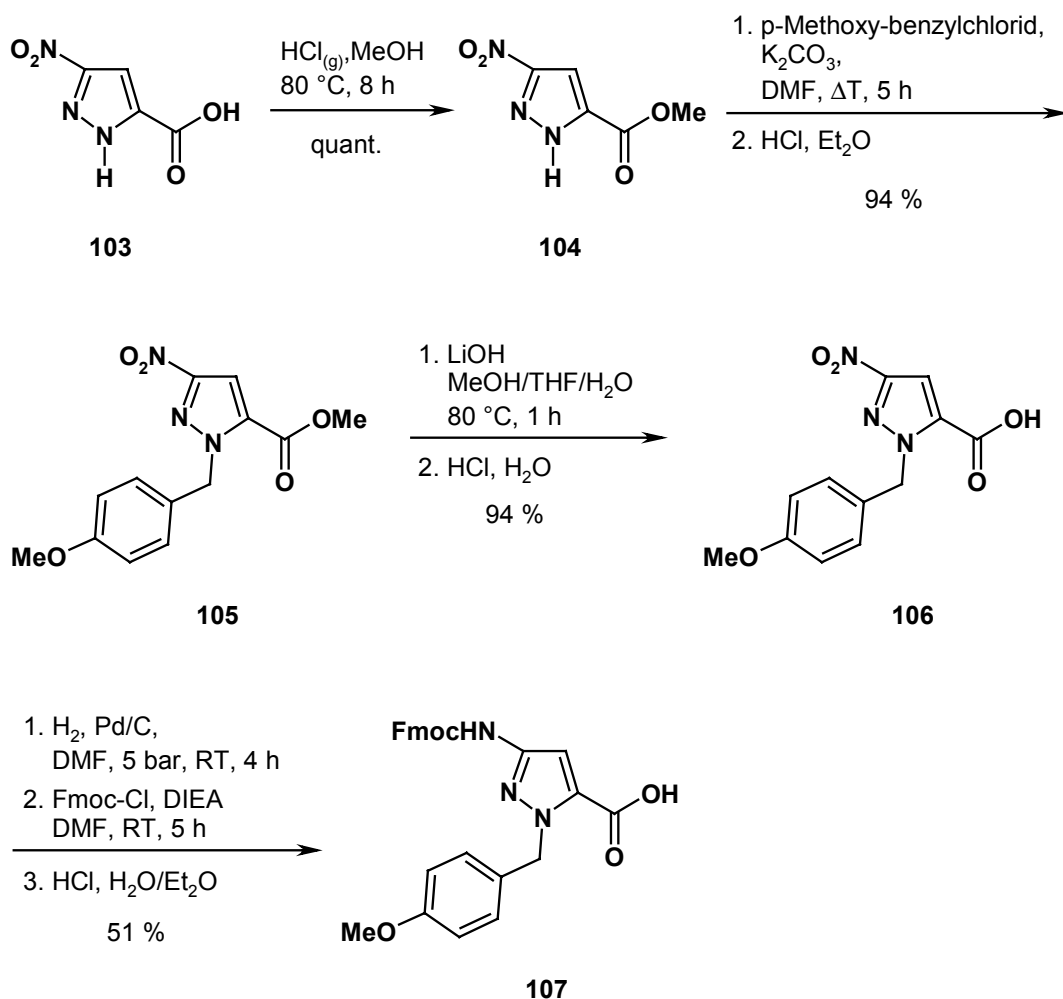


Abb. 67: Synthese der kupplungsfähigen Pyrazolaminosäure Fmoc-Pz(pMB)-OH (**107**).

Die nur moderate Ausbeute (51 %) lässt sich durch die bereits erwähnte verringerte Nukleophilie heteroaromatischer Aminofunktionen (siehe Kapitel 4.3.1) erklären. So liefern beispielsweise analoge Umsetzungen mit *N*-Methylpyrrol- bzw. *N*-Methylimidazolaminosäuren ebenfalls nur Ausbeuten von 66 bzw. 35 %.¹²⁰

4.4.3 Festphasensynthese

Verglichen mit analogen Festphasen-Peptidsynthesen (siehe auch Kapitel 1.1.3.1) sind Peptidsynthesen in Lösung vielfach durch einen höheren Zeitaufwand und niedrigere Gesamtausbeuten gekennzeichnet. So sind z.B. bei der direkten Verknüpfung der hier verwendeten Pyrazol-Derivate hohe Temperaturen und lange Reaktionszeiten von bis zu 48 h nötig.²⁴⁴ Um einen effizienteren Zugang zu Oligoamiden mit künstlichen Pyrazol-Aminosäuren zu gewährleisten, soll im Folgenden ein Festphasenprotokoll etabliert werden. Hierbei wird der Aufbau sowohl linearer als auch pinzettenartiger Struktur motive angestrebt.

Alle Schritte der Festphasensynthese werden in dem Syntheseautomaten „Model 90“ der Firma Advanced ChemTech durchgeführt. Das Protokoll wird so geschrieben, dass die Mischungen aus Monomer, Kupplungsreagenzien und der Base automatisch von den entsprechenden Vorratsgefäßen in das Reaktionsgefäß überführt werden.

Als polymerer Träger kommt das *Sieber* Amid-Harz zum Einsatz.²⁴⁵ Es handelt sich hierbei um ein funktionalisiertes Polystyrol, das mit 1 % Divinylbenzol quervernetzt ist (Abbildung 68). Der Belegungsgrad beträgt etwa 0.2 mmol/g Harz, wobei der Träger im trockenen Zustand eine Korngröße von 100-200 mesh besitzt. Die Abspaltung der synthetisierten Sequenzen vom Polymer erfolgt mit 2 %iger TFA in CH₂Cl₂. Die Oligoamide werden dabei in Form der entsprechenden Amide erhalten, wodurch eventuell eine zusätzliche Bindungsstelle zum Peptid erzeugt werden soll.

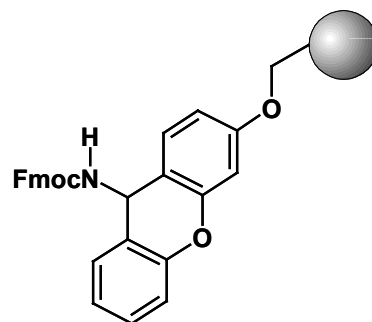


Abb. 68: *Sieber* Amid-Harz.

Im Folgenden sei exemplarisch die Synthese des tetrameren Oligoamids Ac-Pz(*H*)-Val-Val-Pz(*H*)-NH₂ (**110**, siehe Abbildung 73) vorgestellt.

Vor der Anknüpfung der ersten Aminosäure wird das Harz in CH₂Cl₂ aufgequollen und die Fmoc-Schutzgruppe am *Sieber* Amid-Harz mittels 20 % Piperdin in NMP (20 min) entfernt. Zur Vervollständigung der Abspaltung wird der Vorgang wiederholt. Nach jeder Entschützung muss intensiv mit CH₂Cl₂ und NMP gewaschen werden. Die

nachfolgende Erstbelegung (Abbildung 69) erfolgt innerhalb 360 min durch Reaktion des funktionalisierten Polymers mit Fmoc-Pz(pMB)-OH (**107**) in NMP unter Zusatz der Kupplungsreagenzien HOBt und DIPCDI. Um einen quantitativen Umsatz zu erzielen wird die Kupplung wiederholt. Bei Verwendung von nur einem Kupplungszyclus konnte keine vollständige Belegung des Harzes erreicht werden. Der Grad der Erstbelegung wird gravimetrisch durch Vergleich der Polymermasse vor und nach der Belegung unter Berücksichtigung der entsprechenden Molekulargewichte bestimmt.²⁸⁰ Es errechnet sich eine Beladung von 0.19 mmol/g Harz.

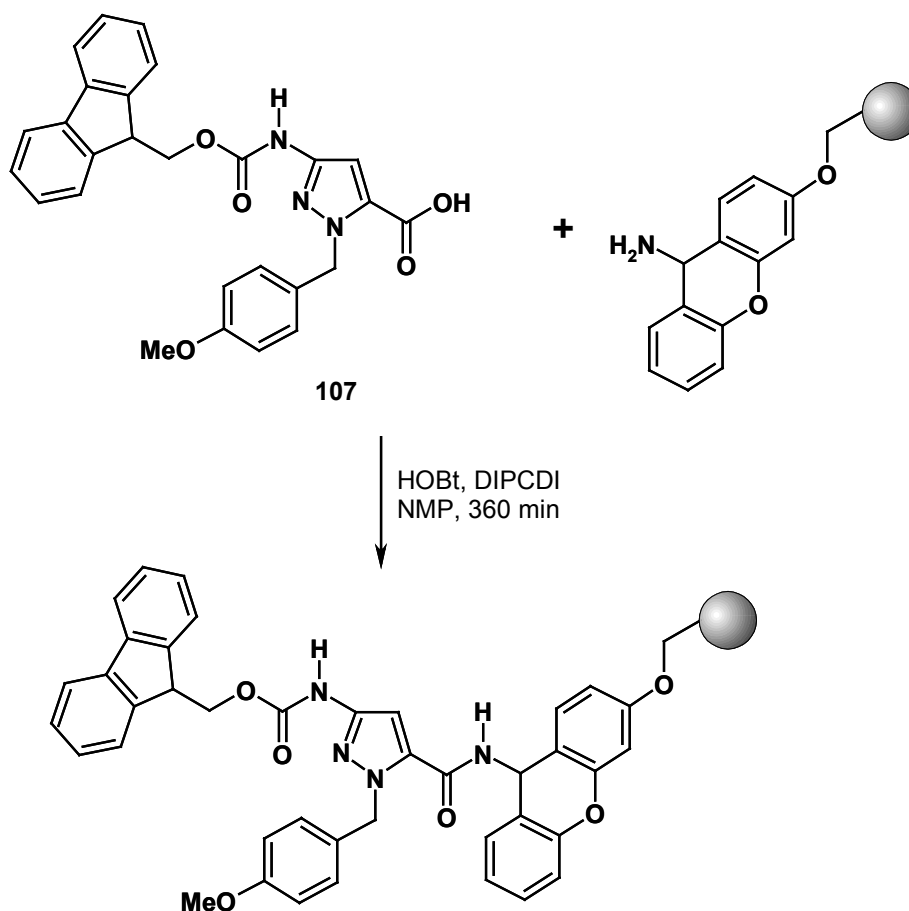


Abb. 69: Erstbelegung des *Sieber* Amid-Harzes mit Fmoc-Pz(pMB)-OH (**107**).

Die Reaktionskontrolle der einzelnen Kupplungsschritte erfolgt mittels analytischer HPLC bzw. HPLC-MS Kopplung, da die freie Amino-Funktion eines nicht umgesetzten Pyrazol-Bausteins nicht zuverlässig mittels Farbreaktionen (Kaiser-Test,¹⁴⁶ NF-31²⁴⁶) nachgewiesen werden kann. Dazu wird ein Aliquot des Harzes entnommen (etwa 4 mg), in eine Kunststoffspritze mit eingelegtem Filterplättchen überführt und die jeweilige Sequenz durch Aufziehen einer 2 %igen TFA in CH₂Cl₂ (1-2 ml) abgespalten (zweimal

1 min). Es werden jeweils 5 bis 10 μl -Proben analysiert.¹⁴⁷ Bei den einzelnen Kupplungsschritten wird dabei eine Kupplungseffizienz $>98\%$ erreicht.

Nach erneutem Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe (in Analogie zu oben beschriebener Vorgehensweise) kann eine weitere Aminosäure angeknüpft werden. Als Kupplungsreagenzien kommen entweder Mischungen aus TBTU, HOBt und DIEA, oder Gemische aus HATU, HOAt und Collidin zum Einsatz.^{247,248} Der äquimolare Zusatz der Additive HOBt bzw. HOAt steigert zum einen die Produktausbeute, zum anderen wird dadurch das Racemisierungsrisiko minimiert.^{249,250} Werden zwei aliphatische Aminosäuren miteinander gekuppelt, ist die Aktivierung mit TBTU ausreichend. In allen anderen Fällen ist die effizientere HATU/HOAt-Methode^{249,251,252} notwendig, um einen vollständigen Umsatz zu erhalten. Jeder Kupplungszyklus wird wiederholt, wobei die einzelnen Schritte jeweils 420 min in Anspruch nehmen. Abbildung 70 zeigt exemplarisch die Reaktionsfolge zur Verlängerung der Oligoamidkette am polymeren Träger.

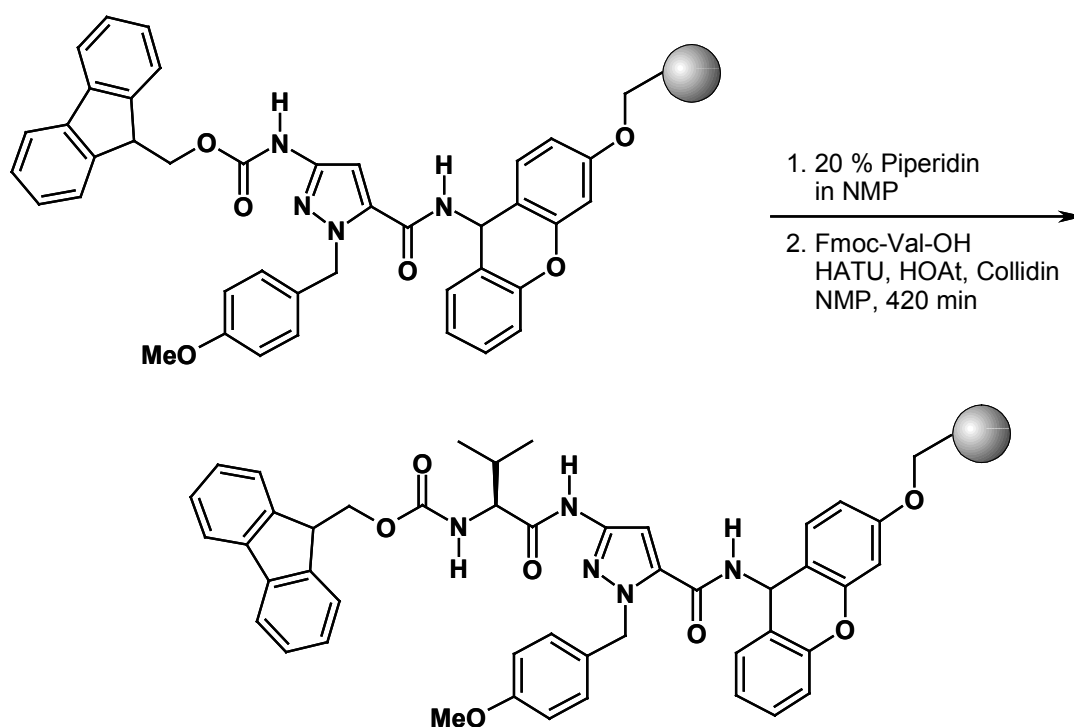


Abb. 70: Exemplarische Darstellung der Fmoc-Abspaltung und Peptidkettenverlängerung durch Fmoc-Val-OH.

Die Festphasen-Peptidsynthese am Harz wird durch die Entfernung der endständigen Fmoc-Schutzgruppe und eine nachfolgende Acetylierung des freien Amins mit einem Gemisch aus Essigsäureanhydrid und DIEA in CH_2Cl_2 abgeschlossen.

Zur Abspaltung des Oligoamids vom polymeren Träger (Abbildung 71) wird das peptidbeladene Harz getrocknet und in eine handelsübliche Kunststoffspritze mit eingelegtem Filterplättchen überführt. Über eine Kanüle wird eine 2 %ige Lösung von TFA in CH_2Cl_2 aufgezogen (etwa 8 ml/g Harz) und die Spritze auf einem *Vortexer* 5 min geschüttelt. Um eine quantitative Ausbeute zu erzielen wird dieser Vorgang acht- bis zehnmal wiederholt. Die vereinigten CH_2Cl_2 -TFA-Gemische werden am Rotationsverdampfer abgezogen. Anschließend wird der erhaltene Feststoff in CH_2Cl_2 gelöst und durch Zugabe von Et_2O wieder ausgefällt. Nach Absaugen wird das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

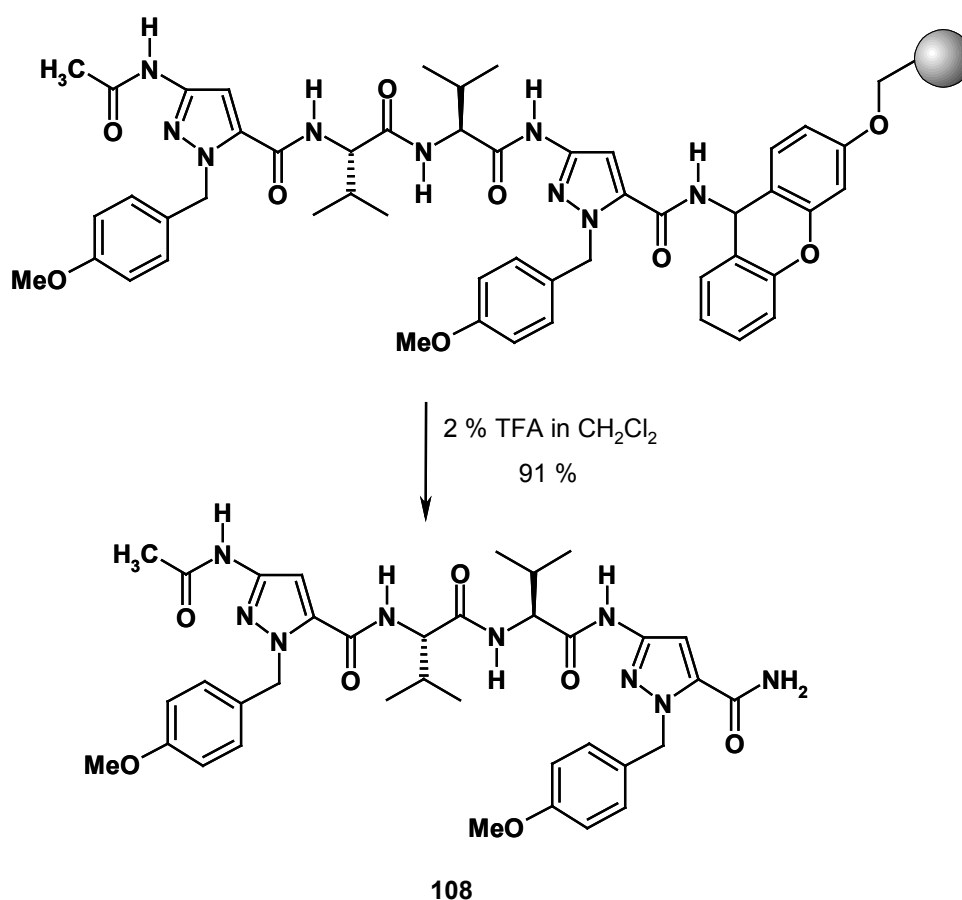
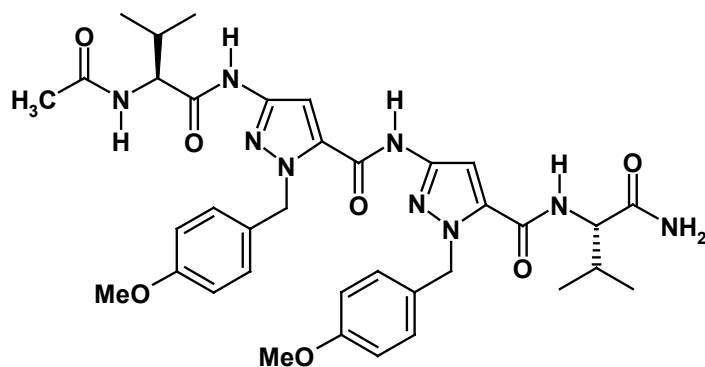


Abb. 71: Abspaltung des Tetrapeptids vom *Sieber* Amid-Harz.

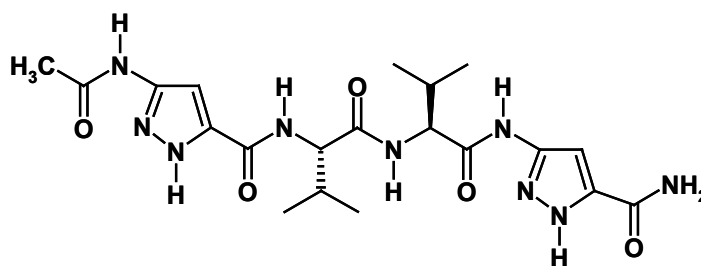
Neben dem in Abbildung 71 dargestellten Ac-Pz(pMB)-Val-Val-Pz(pMB)- NH_2 (**108**) wird auf diesem Wege das Tetrapeptid **109** synthetisiert (Abbildung 72). Die beiden Produkte werden in Form farbloser Feststoffe in 91 % (**108**) bzw. 92 % (**109**) Ausbeute isoliert.



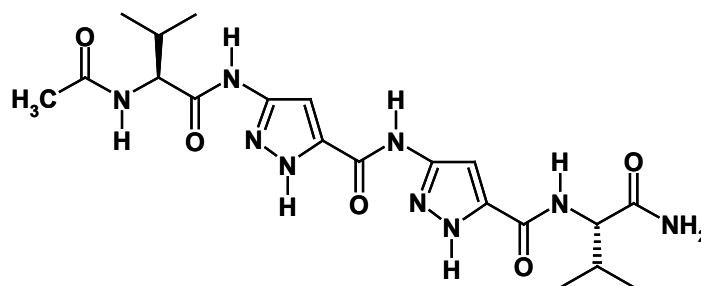
109

Abb. 72: Struktur des Tetrapeptids Ac-Pz(pMB)-Val-Val-Pz(pMB)-NH₂ (**109**).

Zur nachfolgenden Abspaltung der pMB-Schutzgruppe werden die Derivate **108** und **109** in absoluter TFA gelöst und unter Argon-Atmosphäre innerhalb von 20 min auf 70 bis 72 °C erwärmt. Nach 5 min bei dieser Temperatur sind die Tetrapeptide vollständig entschützt. Nach Abziehen der Säure werden die verbleibenden Feststoffe in CH₂Cl₂ gelöst, durch Zugabe von Et₂O wieder ausgefällt und anschließend abgesaugt.



110



111

Abb. 73: Strukturen der freien Tetrapeptide Ac-Pz(H)-Val-Val-Pz(H)-NH₂ (**110**) und Ac-Val-Pz(H)-Pz(H)-Val-NH₂ (**111**).

Die Aufreinigung der so erhaltenen Rohprodukte gelingt durch semipräparative HPLC.¹⁴⁶ Infolge der sauren Abspaltungsbedingungen sowie einem geringen TFA-Zusatz bei der Chromatographie liegen die basischen Ring-Stickstoffe des

Pyrazols in Form ihrer Triflatsalze vor. Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften mit geeigneten Peptiden werden allerdings die freien NH-Funktionen benötigt, weshalb die aus der HPLC erhaltenen Salze in gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung suspendiert, 5 bis 10 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend abgesaugt werden. In nachfolgend aufgenommenen ^{19}F -NMR-Spektren sind keine Fluor-Signale mehr zu erkennen. Die Tetrapeptide **110** und **111** (Abbildung 73) werden in 81 % bzw. 71 % Ausbeute (farblose Feststoffe) erhalten.

4.4.4 ^1H -NMR- und Bindungsstudien

Die Assoziation eines Gastes (z.B. eines Peptides) an einen Wirt (z.B. einen Peptid-Rezeptor) unter Ausbildung eines supramolekularen Komplexes bedingt die Veränderung der chemischen Umgebung von Gast- und Wirtprotonen. Die damit einhergehende Verschiebung der Signale im ^1H -NMR-Spektrum wird als komplexinduzierte chemische Verschiebung (CIS) bezeichnet. Die Stärke der Komplexierung, d.h. die Bindungskonstante zwischen Peptid und Rezeptor, kann mittels ^1H -NMR-Titrations quantitativ bestimmt werden.^{253,254} Als Sonden für das Maß der Komplexierung dienen meist die NH-Protonen der Amidbindungen, da diese infolge der leichten Polarisierbarkeit der entsprechenden Kerne im Allgemeinen die größten Verschiebungen aufweisen. Deuteriertes Chloroform, das vorwiegend als Lösungsmittel für die ^1H -NMR-Titration zum Einsatz kommt, kann hier aufgrund der ungenügenden Löslichkeit der Pyrazol-Oligoamide **110** bzw. **111** in diesem Medium nicht verwendet werden. Die Untersuchung der Bindungseigenschaften erfolgt deshalb zum einen in reinem DMSO, zum anderen in Chloroform/DMSO-Gemischen.

Als Peptid wird das *N/C*-terminal geschützte Ac-Val-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-OMe (**112**) verwendet, welches eine Tendenz zur Ausbildung einer β -Faltblattstruktur aufweist (Abbildung 74).²²⁷ Ferner konnte von der Arbeitsgruppe um *Soto* gezeigt werden, dass durch derartige Sequenzen das Ausfallen von Proteinplaques (Ursache der Alzheimer-Krankheit, siehe auch Kapitel 4.1) inhibiert werden kann.²⁵⁵ Infolge einer Bindung des Peptides an das infektiöse Agens kann letzteres in die lösliche Form zurückgefaltet werden.

Die Darstellung der Verbindung **112** gelingt mittels manueller Festphasensynthese an einem *Wang*-Harz²⁵⁶ unter Verwendung der Fmoc-Schutzgruppenstrategie. Nach Abspalten des Peptides vom polymeren Träger wird die freie Säure durch Umsetzung in Chlorwasserstoff-gesättigtem Methanol verestert und das erhaltene Rohprodukt durch

semipräparative HPLC gereinigt. Verbindung **112** wird in Form eines farblosen Feststoffs in 71 % Ausbeute erhalten (Abbildung 74).

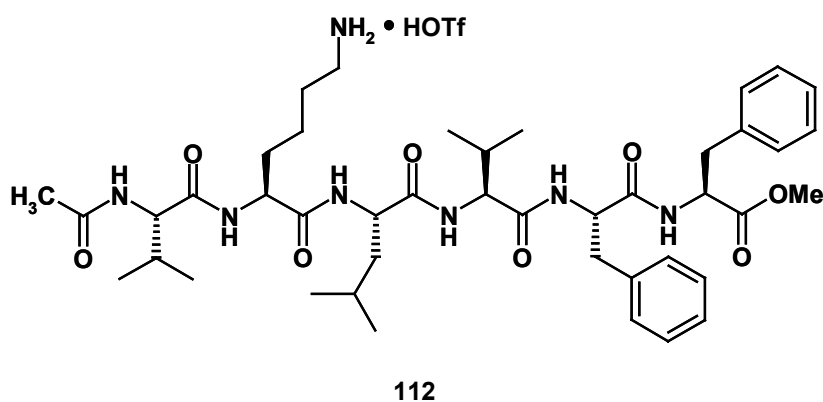


Abb. 74: Struktur des Peptides Ac-Val-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-OMe (**112**).

In den nachfolgenden ^1H -NMR-Titrationsen wird das Peptid **112** ($c \approx 1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$) vorgelegt und 1.52 eq an Pyrazol-Oligoamid **110** bzw. **111** schrittweise zugegeben. Alle Messungen werden in einer Argon-Atmosphäre unter Verwendung getrockneter Lösungsmittel durchgeführt.

Es konnte allerdings bei keiner der beiden untersuchten Verbindungen, weder in reinem DMSO- d_6 , noch in 20 % DMSO- d_6 in CDCl_3 (v/v), eine Verschiebung der Signallagen im ^1H -NMR-Spektrum beobachtet werden. In Anbetracht der bekannten Bindung des monomeren 3-Aminopyrazols an kurze Peptide ($K = 880 \text{ M}^{-1}$ in CDCl_3 , siehe Kapitel 4.1) ist dieses negative Ergebnis verwunderlich. Ein möglicher Grund könnte die kompetitive Assoziation zwischen dem hier verwendeten DMSO und den Pyrazol-Derivaten **110** bzw. **111** sein. Dimethylsulfoxid kann als starker Wasserstoffbrückenakzeptor H-Brücken mit dem Peptid eingehen. Diese Brücken können zum einen stärker als mögliche Wechselwirkungen zwischen dem Peptid und den Rezeptoren **110** und **111** sein, zum anderen könnte eine Verdrängung des DMSO durch die Pyrazol-Oligoamide mit einem unmessbar kleinen „shift“ der beteiligten Amid-Signale einhergehen. In beiden Fällen wäre dann – im Rahmen der Messgenauigkeit – keine Bindung beobachtbar.

Dass auch keine Komplexbildung unter Verwendung von nur 20 % DMSO (v/v) zu detektieren ist, kann zudem durch die Nichtlinearität der Polarität (E_T -Wert) des binären DMSO/ CHCl_3 -Gemisches erklärt werden (Abbildung 75). Infolge der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke vom CHCl_3 zum DMSO wird ein Lösungsmittelgemisch erhalten, welches im Vergleich zu den einzelnen Komponenten völlig andere Eigenschaften

aufweist.²⁵⁷⁻²⁵⁹ Demnach ist das verwendete Gemisch deutlich polarer als es der Gehalt von 20 % (v/v) erwarten lässt.

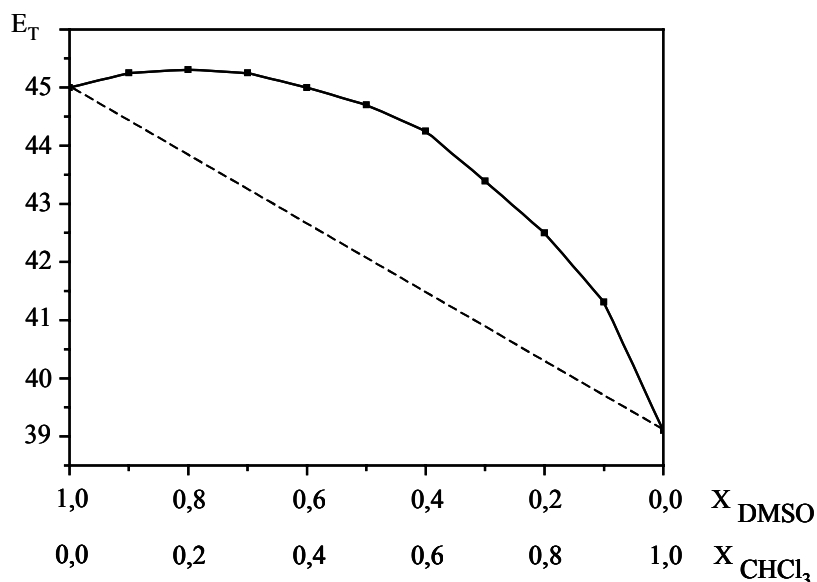


Abb. 75: Abhängigkeit des E_T -Wertes vom Mischungsverhältnis in dem binären $\text{CHCl}_3/\text{DMSO}$ -Gemisch (X: Molenbruch; die gestrichelte Linie gibt den theoretischen linearen Verlauf an).

Ein möglicher Lösungsansatz zur Detektion einer Assoziation zwischen dem Peptid **112** und den Rezeptoren **110** bzw. **111** könnte die Verwendung chiroptischer Messverfahren sein. Da es sich sowohl bei dem Gast als auch bei den verwendeten Wirten um chirale Substanzen handelt, bietet sich hierfür die Circular dichroismus-(CD) Spektroskopie an.²⁶⁰ Im Gegensatz zur ^1H -NMR-Titration können derartige Untersuchungen bei einer 100fach geringeren Konzentration (etwa $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$) durchgeführt werden. Als Lösungsmittel wird Acetonitril verwendet, das eine hohe optische Durchlässigkeit besitzt.

Abbildung 76 zeigt exemplarisch die CD-Spektren des Pyrazol-Oligoamides **110** sowie des Peptides **112**. Während das Derivat **110** ein positives CD-Couplet bei 230 nm aufweist (Cotton-Effekte bei 242 nm, $\Delta\epsilon = +17.07 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und 209 nm, $\Delta\epsilon = -16.88 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), zeigt **112** keine definierte Sekundärstruktur. Wenn sich in Mischungen der beiden Verbindungen ein supramolekularer Komplex ausbildet, müssten Änderungen in diesen Ausgangsspektren zu sehen sein. Dies könnte sich beispielsweise dahingehend bemerkbar machen, dass in dem Peptid **112** eine β -Faltblattstruktur induziert wird. Es werden jeweils 2:1-, 1:1-, 1:2- und

1:4-Verhältnisse von Peptid:Rezeptor vermessen. Leider sind auch mit dieser Methode keine Hinweise auf eine Komplexbildung zu detektieren.

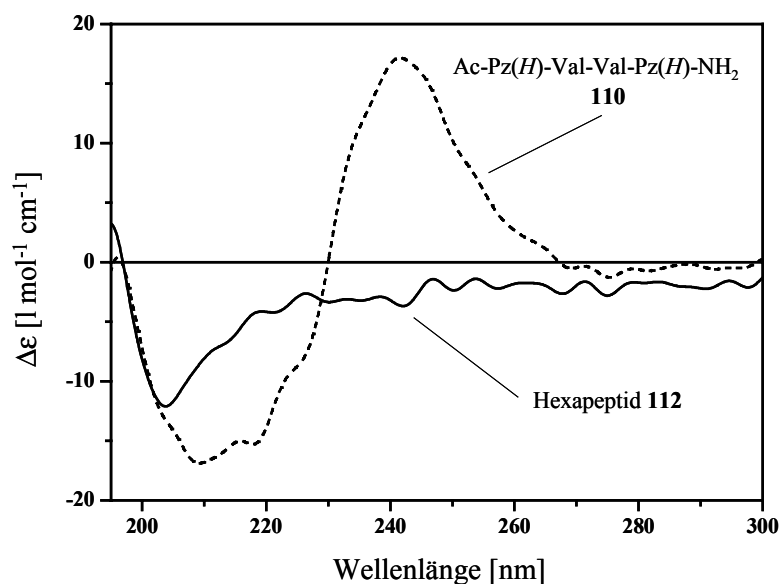


Abb. 76: CD-Spektren des Oligoamids **110** und des Hexapeptids **112** in CH₃CN.

Ein weiterer Grund für das Ausbleiben einer Assoziation zwischen dem Peptid und den Pyrazol-Oligoamiden **110** bzw. **111** könnte eine nicht-lineare Konformation der Rezeptoren sein. So ist es denkbar, dass diese Derivate – anders als in Abbildung 73 schematisch dargestellt – eine gefaltete Konformation einnehmen. Um dies zu untersuchen werden stellvertretend für das Tetrapeptid **110**, das aufgrund der Bis-Valin-Einheit im Vergleich zu **111** eine größere Flexibilität aufweisen sollte, (H, H)-COSY und ROESY-Experimente sowie temperaturabhängige ¹H-NMR-Messungen durchgeführt.

Die eindeutige Zuordnung sowohl der CH- als auch der NH-Protonen von Verbindung **110** gelingt durch die Aufnahme des in Abbildung 77 dargestellten ROESY-Spektrums (durch Pfeile gekennzeichnete Peaks bzw. Kreuzsignale werden im Anschluss diskutiert) in Verbindung mit COSY- bzw. HMQC-Spektren (nicht abgebildet).

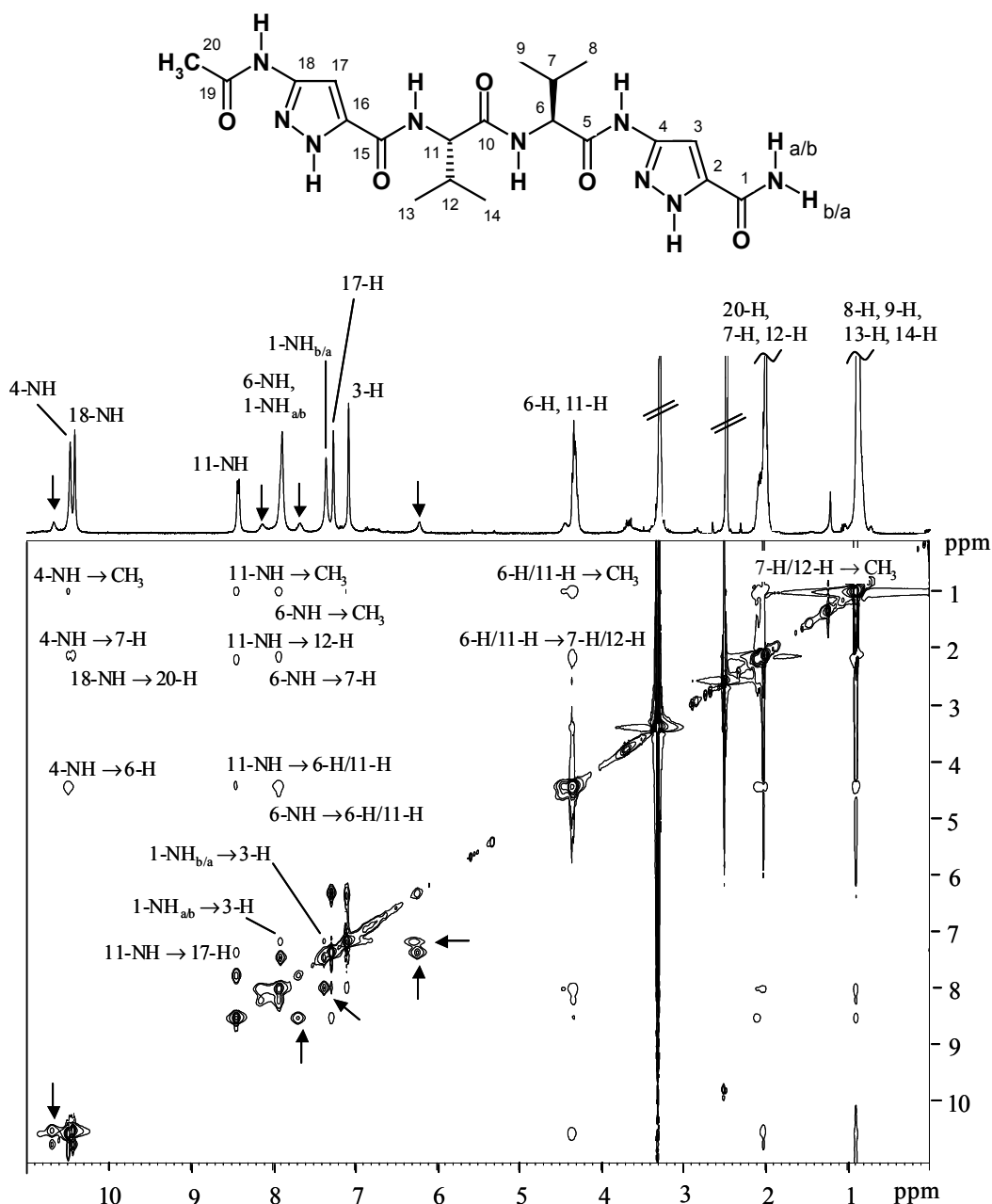


Abb. 77: Phasensensitives ROESY-Spektrum der Verbindung **110** in DMSO-d₆ (positive Kreuzpeaks: Austausch-Effekte, negative Kreuzpeaks: NOE-Effekte; die Signale der beiden Ring-Stickstoffe bei 12.97 ppm bzw. 13.01 ppm sind nicht abgebildet; mit Pfeilen gekennzeichnete Peaks im ¹H-NMR-Spektrum bzw. Kreuzsignale im 2D-Spektrum werden im Anschluss diskutiert; aus Gründen der Übersichtlichkeit seien die CH₃-Gruppen 8-H, 9-H, 13-H und 14-H im 2D-Spektrum durch CH₃ abgekürzt).

Bei höherer Auflösung können im ROESY-Spektrum zusätzlich NOE-Effekte zwischen 4-NH und 3-H, 18-NH und 17-H sowie 4-NH und 1-NH_{a/b}/6-NH beobachtet werden (siehe dazu die in Abbildung 78 mit einem Kasten markierten Kreuzpeaks). Unter den verwendeten Bedingungen werden für **110** keine Signale detektiert, die auf eine

mögliche Rückfaltung des Tetrapeptids bzw. eine nicht-lineare Anordnung des Oligoamid-Rückgrates schließen lassen.

Neben der Hauptkonformation wird eine zweite Konformation beobachtet, die analoge Kreuzpeaks zeigt (Abbildung 78).

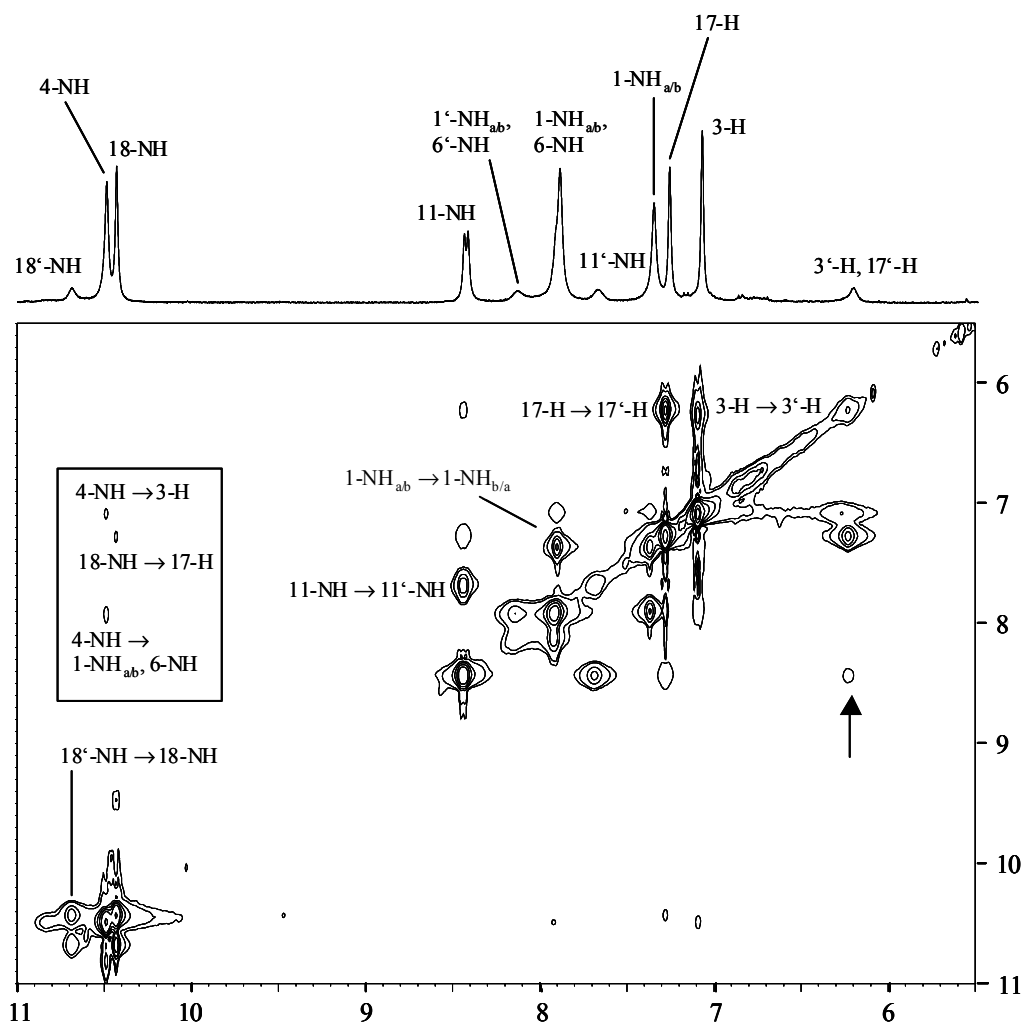


Abb. 78: Ausschnitt aus dem phasensensitiven ROESY-Spektrum der Abbildung 10 (die zugeordneten Kreuzsignale zeigen den Austausch zwischen zwei Konformeren der Verbindung **110**; die mit einem Kasten markierten Signale sind NOE-Effekte zwischen Protonen der Hauptkonformation, die erst bei höherer Auflösung zu sehen sind)

Auch hier werden keine „unerwarteten“ Signale beobachtet. Bei dem mit einem Pfeil gekennzeichneten Peak handelt es sich um ein sogenanntes „Geistersignal“, das einen NOE-Effekt zwischen den beiden Konformeren vorspiegelt. Dieses Phänomen ist bereits bei anderen Strukturen beobachtet worden.²⁶¹

Weitere Hinweise auf die Sekundärstruktur von Peptiden können durch die Aufnahme temperaturabhängiger ^1H -NMR-Spektren gewonnen werden, da die Orientierung der Amidbindungen im Allgemeinen durch intra- bzw. intermolekulare sowie zum Lösungsmittel ausgebildete Wasserstoffbrückenbindungen festgelegt ist. Nimmt das Peptid in Lösung nur eine Konformation ein oder ist eine Konformation sehr dominant, so beobachtet man bei der Ausbildung intramolekularer H-Brücken einen Temperaturgradienten ($\Delta\delta/\Delta T$) der beteiligten NH-Signale von $\Delta\delta/\Delta T < 2\text{--}3 \times 10^{-3}$ ppm/K in DMSO. Dagegen weisen Temperaturgradienten von über 4×10^{-3} ppm/K auf externe NH-Orientierungen hin.²⁶²

Von 302 K bis 343 K ergibt sich für die NH-Protonen 2-NH/16-NH ein Temperaturgradient von 5.55×10^{-3} ppm/K, für 4-NH 6.74×10^{-3} ppm/K, für 18-NH 6.07×10^{-3} ppm/K sowie für 11-NH 7.76×10^{-3} ppm/K. Diese Werte stützen die bereits erhaltenen Ergebnisse und weisen nicht auf eine Hauptkonformation in Lösung mit intramolekularen Wasserstoffbrücken hin.

4.5 Synthese eines Rezeptors mit Pinzettenstruktur

4.5.1 Einführung

Neben den bereits beschriebenen Peptidrezeptoren findet vielfach eine weitere Klasse von synthetischen Modellverbindungen, die als sogenannte Pinzetten- oder „Tweezer“-Rezeptoren^{263,264} bezeichnet werden, Anwendung. Das Grundgerüst derartiger Erkennungseinheiten besteht aus einer Kopfgruppe, an der zwei Seitenarme fixiert sind. Letztere sind aus geeigneten Funktionalitäten aufgebaut, um an das Rückgrat des gewünschten Substrates zu binden (Abbildung 79a).

Ein Ansatz, der von *Kilburn* und Mitarbeitern verfolgt wird, ist in Abbildung 79b dargestellt. Zusätzlich zu den Erkennungseinheiten in den beiden Seitenarmen, die aus peptidisch verknüpften Aminosäuren aufgebaut sind, besitzen die Rezeptoren eine Bindungsstelle für den freien C-Terminus geeigneter Peptide.²⁶⁵⁻²⁶⁷ Diese als „Carboxylic Acid Binding Site“ oder kurz CBS bezeichnete Einheit ist in der Kopfgruppe der pinzettenförmigen Rezeptoren lokalisiert.

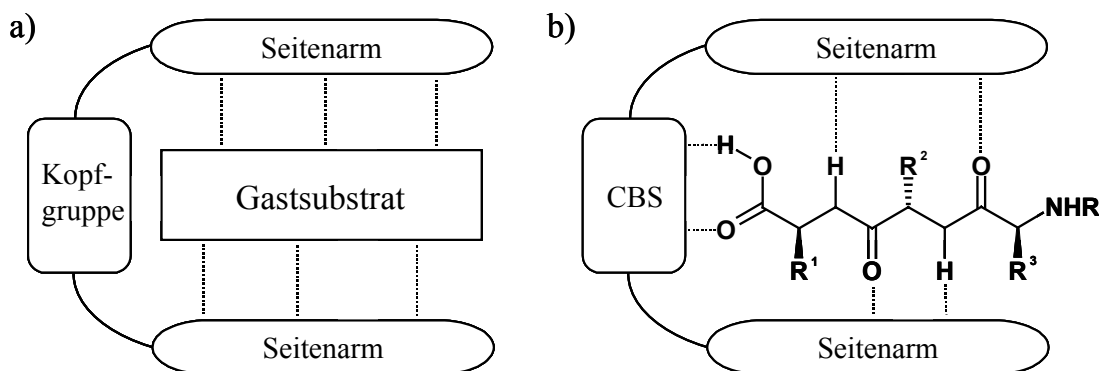
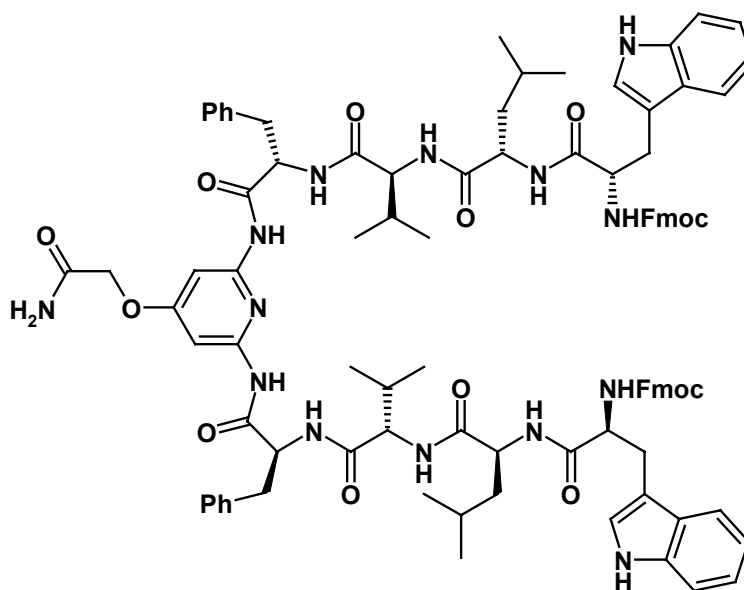


Abb. 79: a) Schematische Darstellung eines Pinzetten-Rezeptors, der aus einer Kopfgruppe und zwei Seitenarmen aufgebaut ist, und dessen Wechselwirkung mit einem geeigneten Gastsubstrat. b) Schematische Darstellung eines Pinzetten-Rezeptors mit einer Bindungsstelle für Carbonsäuren („carboxylic acid binding site“, CBS) und dessen Interaktion mit einem Peptid.

Basierend auf den Arbeiten aus der Gruppe um *Hamilton*^{268,269} synthetisierten *Kilburn* und Mitarbeiter „Tweezer“-Strukturen, die als zentralen Baustein ein Derivat des 2,6-Diaminopyridins tragen (Abbildung 80).



113

Abb. 80: Beispiel eines Pinzetten-Rezeptors nach *Kilburn* zur Erkennung C-terminal ungeschützter Tripeptide (CBS: 2,6-Diaminopyridin, Seitenarme: N-terminal geschütztes Tetrapeptid Phe-Val-Leu-Trp)

Die zusätzliche Funktionalisierung in der 4-Position des Pyridins, ermöglicht die Anknüpfung der CBS-Einheit an einen polymeren Träger, an dem die Synthese der

beiden Rezeptor-Arme nach der „split-and-mix“-Strategie²⁷⁰ durchgeführt wird. Die Selektivitäten der „Tweezer“-Moleküle für bestimmte Tripeptide beruhen auf dem unterschiedlichen sterischen Anspruch der jeweiligen Peptide. Unter Verwendung des Rezeptors **113** erreichen sie Bindungskonstanten von $K_a = 2.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ in DMSO-Chloroform Gemischen (2/98, v/v).

Eine mögliche Erhöhung der Bindungskonstanten der synthetisierten Pyrazol-Oligoamide **110** und **111** (siehe Abbildung 73) sowie dazu analogen Strukturen könnte durch den Einbau einer zusätzlichen Bindungsstelle für den freien C-Terminus der zu erkennenden Peptide erreicht werden. Im Folgenden soll deshalb die Synthese eines pinzettenförmigen Peptidrezeptors vorgestellt werden, der, neben Erkennungseinheiten auf der Basis des Aminopyrazols (Seitenarme), eine Bindungsstelle für C-terminal ungeschützte Peptide (Kopfgruppe) besitzt.

4.5.2 Synthese

Um die Darstellung des „Tweezers“ an der festen Phase durchführen zu können, muss zuerst ein Anker-Baustein synthetisiert werden, der auf dem polymeren Träger immobilisiert werden kann. Die von *Kilburn* und Mitarbeitern eingeführte Kopfgruppe (siehe Abbildung 80) kann hier nicht eingesetzt werden, da die so erhaltene Bindungstasche zwischen den beiden Pyrazol-Oligoamid-Seitenketten nicht genug Platz für eine Erkennung von Peptiden bietet. Zudem ist die von ihnen etablierte Synthese sehr aufwendig (10 Stufen) und liefert nur geringe Gesamt-Ausbeuten (4.5 %).²⁶⁷

Aus diesen Gründen wird eine CBS verwendet, die durch die Verknüpfung zweier 2,6-Diaminopyridin-Einheiten über einen 5-Nitro-Isophthalsäure-Spacer darstellbar ist.²⁷¹ Die NO₂-Gruppe in *meta*-Stellung zu den beiden Säure-Funktionalitäten dient zur späteren Verankerung auf dem Harz. Computerberechnungen mit einem Pinzetten-Molekül, das aus einer derartigen Kopfgruppe und zwei Pyrazol-Oligoamid-Seitenarmen aufgebaut ist, zeigen, dass die Erkennung eines Peptides mit β -Faltblattstrukturen prinzipiell möglich sein könnte (Abbildung 81).²²⁹ Eine eingehendere Diskussion möglicher Konformationen dieses „Tweezers“ mittels ¹H-NMR-spektroskopischer Methoden erfolgt im Anschluss an dieses Kapitel.

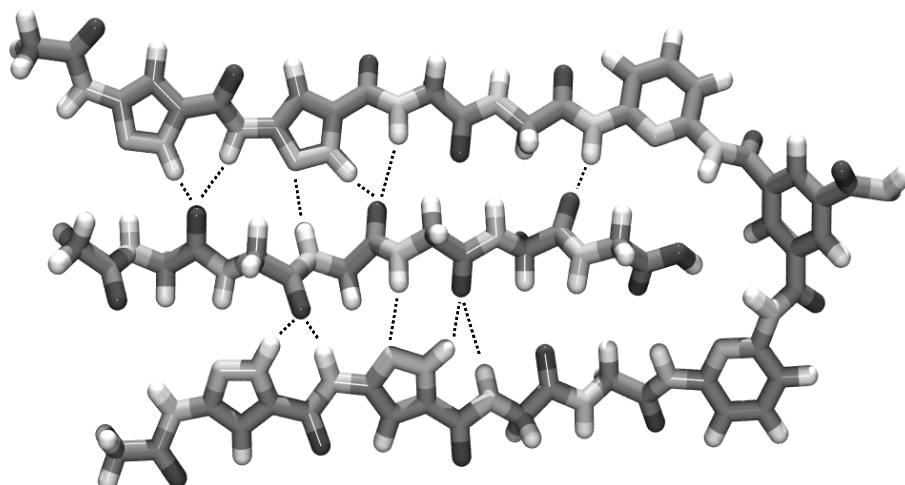


Abb. 81: Semiempirisch auf PM3-Niveau berechnete Molekülgeometrie eines Komplexes zwischen einem *N/C*-terminal geschützten hexameren Glycin und einem „Tweezer“ mit zwei Ac-Pz(*H*)-Pz(*H*)-Gly-Gly Seitenarmen (die gestrichelten Linien symbolisieren die theoretisch möglichen Wasserstoffbrücken zwischen dem Peptid und den Pyrazol-Oligoamiden).

Die Synthese des Anker-Moleküls beginnt mit der Umsetzung der Verbindung **114** mit Oxalylchlorid in CH_2Cl_2 unter DMF-Katalyse zum entsprechenden Säurechlorid, das ohne weitere Reinigung umgesetzt wird (Abbildung 82).²⁷¹ Nach Zugabe eines Überschusses von 2,6-Diaminopyridin (10 eq) und NEt_3 in THF wird **115** in Form eines leicht gelben Feststoffs in 81 %iger Ausbeute isoliert. Anschließende Peptidkupplung mit Fmoc-Gly-OH, EDC•HCl und HOAt in DMF liefert das geschützte Derivat **116** in guter Ausbeute (80 %, farbloser Feststoff). Eine analoge Kupplung unter Verwendung von DCC und HOBt lieferte auch nach sehr langen Reaktionszeiten (5 d) keinen vollständigen Umsatz. Auf dem alternativen Weg, die freien Amino-Gruppen der Verbindung **115** direkt durch Reaktion mit Fmoc-Cl unter Zusatz von Base (DIEA, NEt_3) zu schützen konnte kein Produkt isoliert werden.

Im nächsten Schritt der Synthese muss die Nitro-Gruppe reduziert werden. Dies gelingt durch Umsetzung mit Raney-Nickel und H_2 in einem THF-MeOH-Gemisch (2:1). Das Amin **117** wird in 96 %iger Ausbeute in Form eines farblosen Feststoffs erhalten (Abbildung 82). Andere Standard-Reduktionsmethoden (Pd/C 10 % oder Pd-black) liefern ausschließlich das Hydroxylamin.

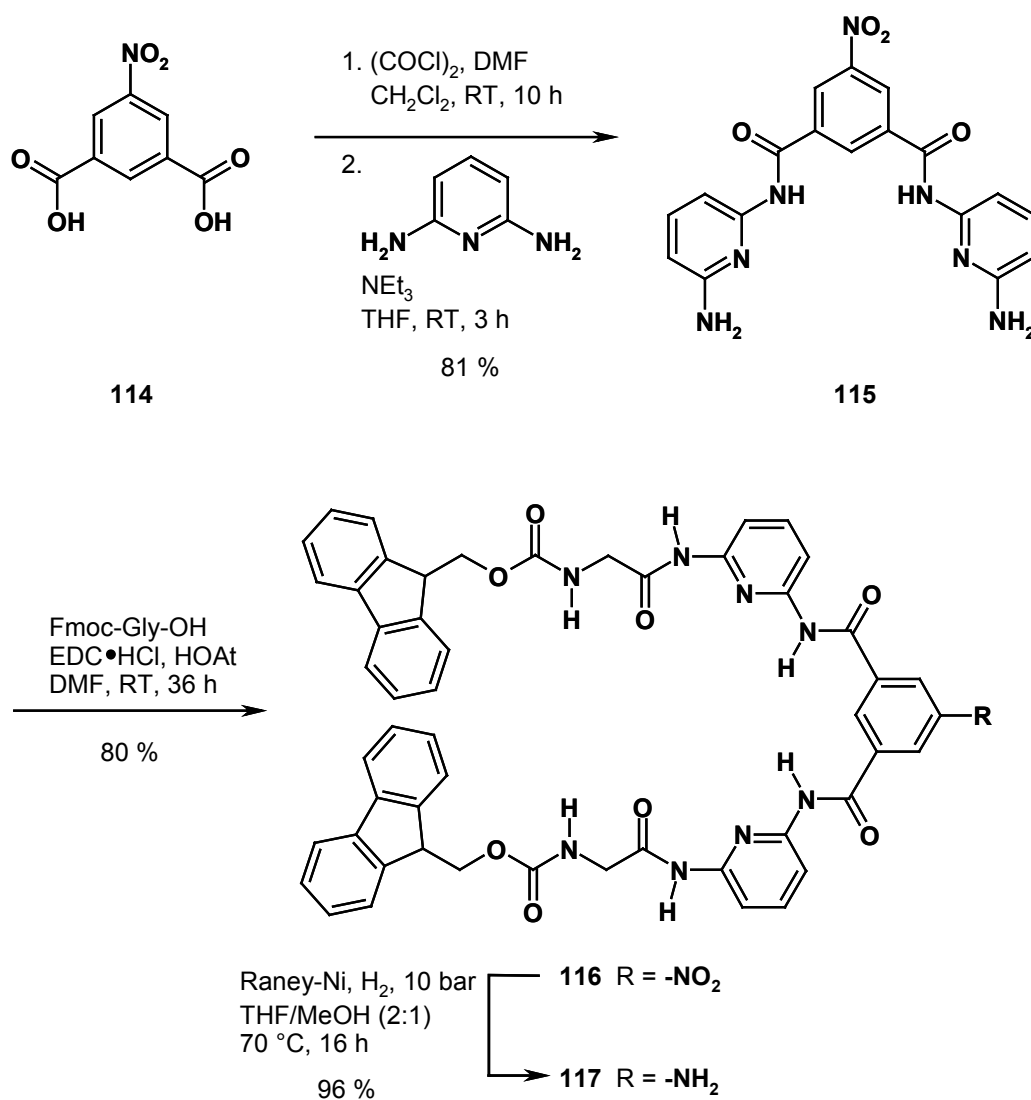


Abb. 82: Synthese der Verbindungen **116** und **117**.

Nachfolgende Reaktion der Verbindung **117** mit Bernsteinsäureanhydrid in Dioxan liefert unter Ringöffnung das Carbonsäure-Derivat **118** (farbloser Feststoff, 87 % Ausbeute, Abbildung 83),²⁷² das auf einem polymeren Träger verankert werden kann. Bei der nun folgenden Festphasen-Peptidsynthese kommt wiederum das *Sieber* Amid-Harz zum Einsatz (Beladung 0.2 mmol/g Harz).²⁴⁵ Die Immobilisierung des Anker-Bausteins Fmoc-Gly-BPP-Ber-OH (**118**) auf dem polymeren Träger, die einzelnen Kupplungsschritte sowie die Abspaltung vom Harz werden in Analogie zu bereits Beschriebenem (siehe Kapitel 4.4.3) durchgeführt. Deshalb soll hier nur kurz darauf eingegangen werden.

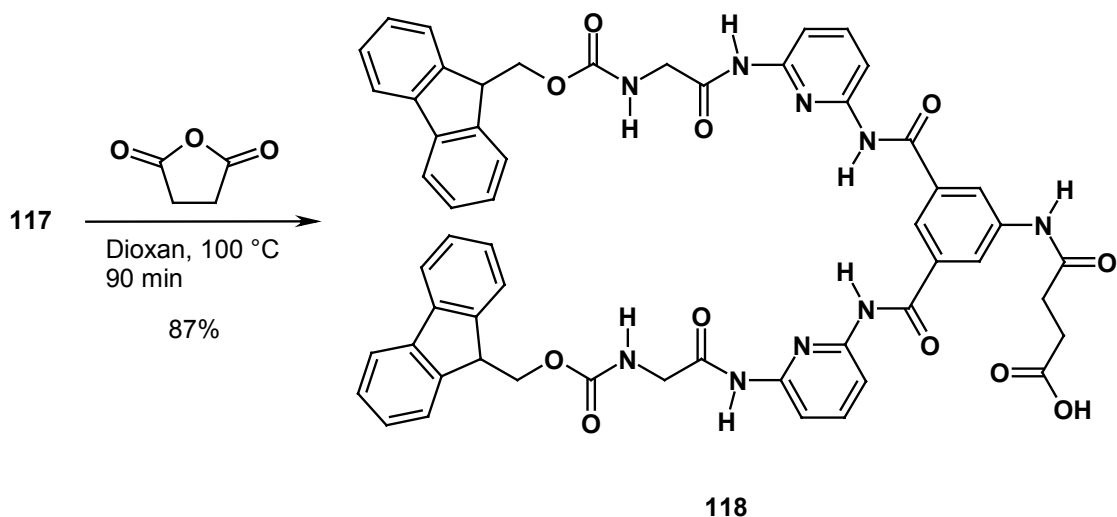


Abb. 83: Darstellung des Derivates 118.

Die Erstbelegung des Polymers nimmt 360 min in Anspruch, wobei nochmals 360 min nachgekuppelt wird (Harzbeladung: 0.18 mmol/g Harz). Die Anknüpfung eines weiteren Glycins gelingt unter Verwendung von TBTU, HOBt und DIEA in NMP (zweimal 120 min). Die nachfolgende Kettenverlängerung um zwei Pyrazol-Aminosäuren erfolgt jeweils mit **107** (siehe Abbildung 67), HATU, HOAt und Collidin in NMP (zweimal 420 min). Abschließend werden die endständigen Fmoc-Schutzgruppen entfernt, die freien Amino-Funktionen mit einer Mischung aus Ac₂O und DIEA in CH₂Cl₂ acetyliert und das Peptid vom Harz abgenommen.

Abbildung 84 zeigt das nach Abspalten vom Polymer erhaltene pinzettenförmige Oligoamid [Ac-Pz(pMB)-Pz(pMB)-Gly-Gly]₂-BPP-Ber-NH₂ (**119**). Zur Aufreinigung des Rohproduktes wird der Feststoff in CH₂Cl₂ suspendiert, im Ultraschallbad behandelt und anschließend wieder abfiltriert. Dieses Vorgehen wird mehrmals wiederholt. Verbindung **119** wird in 88 %iger Ausbeute in Form eines beigen Pulvers isoliert.

Die nachfolgende Entfernung der pMB-Schutzgruppen sowie die Freisetzung der cyclischen NH-Funktionen aus ihren Triflat-Salzen gelingt nach bereits beschriebener Methode (siehe Kapitel 4.4.3). Die Aufreinigung erfolgt in Analogie zu der von **119**. Der Pinzetten-Rezeptor [Ac-Pz(*H*)-Pz(*H*)-Gly-Gly]₂-BPP-Ber-NH₂ (**120**) wird in Form eines beigen bis leicht gelblichen Pulvers in 87 % Ausbeute isoliert (Abbildung 84).

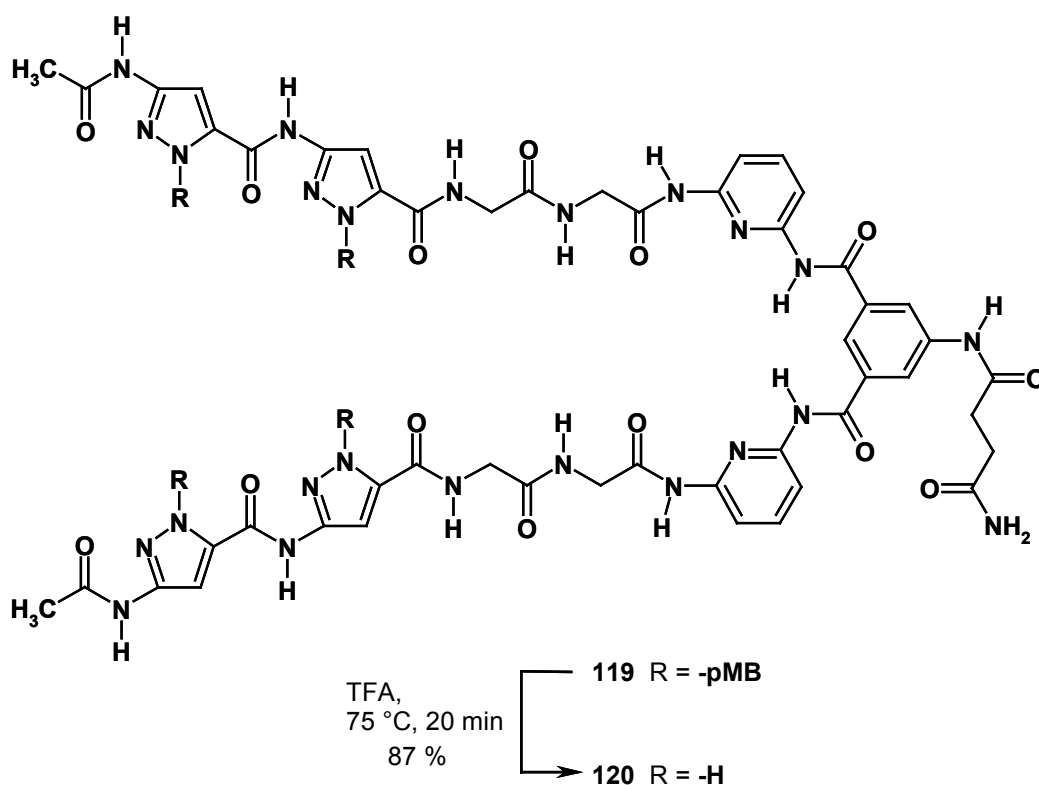


Abb. 84: Strukturformeln des nach Abspalten von der Festphase erhaltenen „Tweezers“ [Ac-Pz(pMB)-Pz(pMB)-Gly-Gly]₂-BPP-Ber-NH₂ (**119**) sowie des entschützten Analogons [Ac-Pz(H)-Pz(H)-Gly-Gly]₂-BPP-Ber-NH₂ (**120**).

4.5.3 ¹H-NMR- und Bindungsstudien

Analog zu Kapitel 4.4.4 werden anhand der Pinzettenstrukturen **119** und **120** mittels zweidimensionaler (H, H)-COSY und ROESY-Experimente Aussagen bezüglich möglicher Konformationen erwartet. Temperaturabhängige ¹H-NMR-Messungen des vollständig entschützten „Tweezers“ **119** sollen die erhaltenen Ergebnisse unterstreichen.

Die ROESY-Spektren der Strukturen **119** und **120** zeigen analoge Kreuzpeaks. Da letztere jedoch intensitätsschwächer und somit nur bei hoher Vergrößerung zu sehen sind, soll die Diskussion anhand des geschützten Derivates **119** erfolgen (Abbildung 85). Unter den verwendeten Bedingungen werden keine Signale detektiert, die auf eine mögliche Rückfaltung bzw. eine nicht-lineare Anordnung des Oligoamid-Rückgrates der beiden Seitenarme des Pinzetten-Rezeptors schließen lassen.

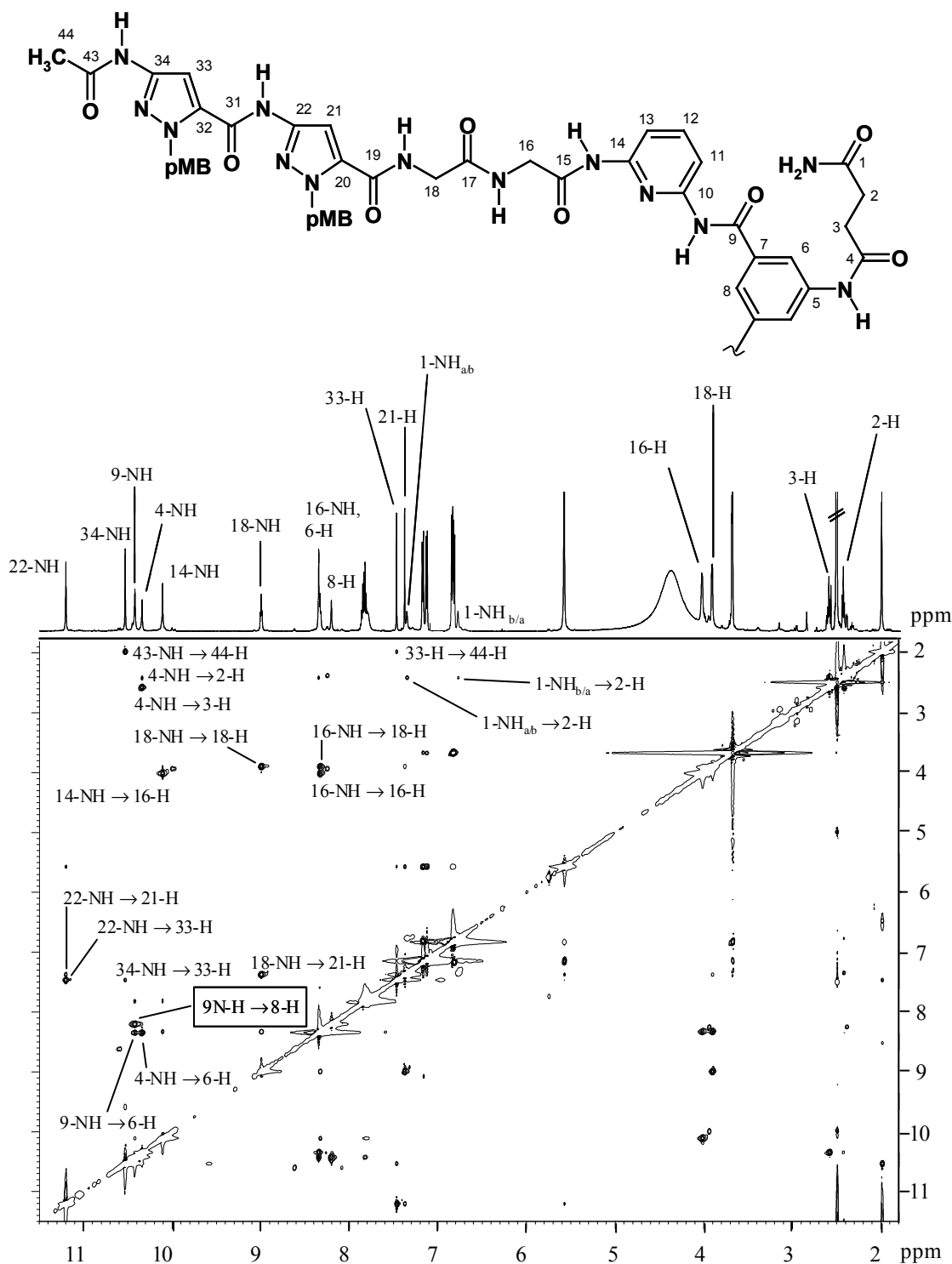


Abb. 85: Phasensensitives ROESY-Spektrum der Verbindung **119** in DMSO-d₆ (die Signale der Ring-Stickstoffe im Bereich von 13.00-13.80 ppm sind nicht abgebildet; es sind ausschließlich Kreuzpeaks zugeordnet, die zur Aufklärung der vorliegenden Konformation von Interesse sind).

Hervorzuheben ist der – in Abbildung 85 mit einem Kasten markierte – intensitätsstarke Kreuzpeak zwischen dem Amid-NH am Kohlenstoff C-9 und dem Proton am

Kohlenstoff C-8. Dieses Signal belegt, dass der Isophthalsäure-Spacer der verwendeten Kopfgruppe in Lösung zu einem gewissen Teil in der für eine mögliche Bindung nötigen *cisoiden*-Konformation vorliegt.

Die temperaturabhängigen Messungen mit dem Rezeptor **119** im Bereich von 302 K bis 343 K ergeben für die betrachteten NH-Signale (siehe Abbildung 85) folgende Temperaturgradienten: 8.22×10^{-3} ppm/K (22a, b-NH), 5.43×10^{-3} ppm/K (34a, b-NH), 6.08×10^{-3} ppm/K (9a, b-NH), 6.80×10^{-3} ppm/K (14a, b-NH) sowie 6.81×10^{-3} ppm/K (18a, b-NH). Diese Werte weisen nicht auf eine Hauptkonformation in Lösung mit intramolekularen Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Seitenarmen des „Tweezers“ hin.

Die abschließenden Untersuchungen der Bindungseigenschaften des synthetisierten Rezeptors mittels ^1H -NMR-Titration müssen aufgrund der ungenügenden Löslichkeit in anderen Solventien in reinem DMSO durchgeführt werden. Als Peptid kommt die mit **112** (siehe Abbildung 74) identische Sequenz **121** zum Einsatz, die einen freien C-Terminus besitzt (Abbildung 86).

In Analogie zu bereits beschriebener Vorgehensweise (siehe Kapitel 4.4.4) wird das Peptid **121** ($c \approx 1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$) vorgelegt und 1.52 eq des „Tweezers“ **120** schrittweise zugegeben. Alle Messungen werden in einer Argon-Atmosphäre unter Verwendung von getrocknetem DMSO durchgeführt.

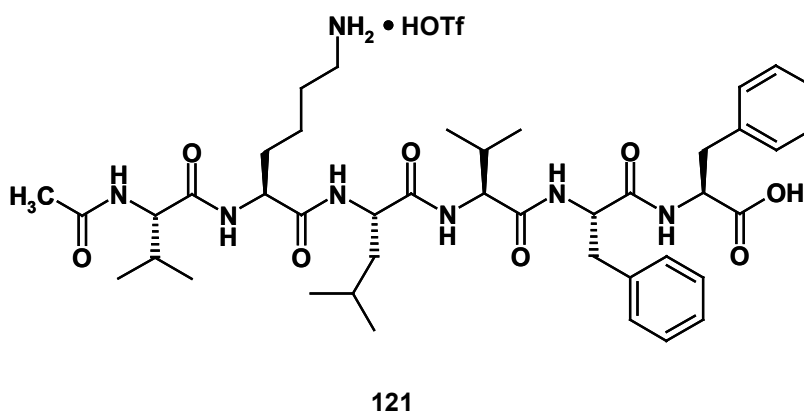


Abb. 86: Struktur des Peptides Ac-Val-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-OH (**121**).

Es konnte allerdings auch durch die zusätzliche Bindungsstelle des Isophthalamids keine Verschiebung der Signallagen im ^1H -NMR-Spektrum und somit keine Assoziation zwischen **120** und dem Peptid **121** beobachtet werden.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die bisher verwendeten Lösungsmittel bzw. Lösungsmittel-Gemische nicht ideal für eine Detektion möglicher Wechselwirkungen zwischen Peptid und Rezeptor sind. Aus diesem Grund sollen die hier synthetisierten Derivate in den weiterführenden Arbeiten auf diesem Gebiet geeignet modifiziert werden, um eine Löslichkeit in anderen Solventien zu gewährleisten. Mittels der etablierten Festphasensynthese sind derartige Strukturvariationen leicht durchführbar. So soll insbesondere die Einführung polarer Aminosäuren bzw. geladener Kopfgruppen Untersuchungen in Wasser oder wasserhaltigen Gemischen ermöglichen. Erste Studien aus der Arbeitsgruppe um *Schrader* sowie mikrokalorimetrische Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe zeigen Wechselwirkungen zwischen Peptidstrukturen und Pyrazol-Rezeptoren in diesen Medien. Im Gegensatz zu organischen Solventien beruhen die Interaktionen hier vermutlich auf hydrophoben Kontakten zwischen den Peptiden und den Pyrazol-Derivaten.

In einem weiteren Ansatz soll die Kopfgruppe des in dieser Arbeit entwickelten Pinzetten-Rezeptors **120** gegen andere Erkennungseinheiten ausgetauscht werden. Hierfür bietet sich beispielsweise der in unserer Arbeitsgruppe bereits entwickelte Baustein zur selektiven Bindung der Imidazol-Seitenkette des Histidins („His-Tag“) an.²⁷³ Die nach Koordination sich ausbildenden H-Brücken oder hydrophoben Kontakten zwischen Peptid und Rezeptor sollten so begünstigt sein.

C Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit werden heteroaromatische Oligoamide als Liganden für eine Affinitätschromatographische Aufreinigung von dDNS eingesetzt. Dazu wird das tetramere *N*-Methylpyrrol-Peptid **66** unter Verwendung eines Peptidsyntheseautomaten dargestellt, das über eine endständige Glycin-Einheit auf einem polymeren Träger immobilisiert werden kann. Die Eigenschaften dieses funktionalisierten Polymers (**67**) werden anschließend mittels eines UV-Assays untersucht. Verglichen mit einem kommerziell erhältlichen Ionentauscher zeigt sich eine etwa um den Faktor 5 geringere Kapazität für „pTriExTM-1 DNA“. Diese Affinität ist für eine effiziente Aufreinigung von Plasmiden verhältnismäßig gering, für eine Trennung von dDNS-Fragmenten aber möglicherweise ausreichend.

Durch den Austausch des endständigen Glycins der Verbindung **66** gegen einen Cystein-Baustein wird die Sequenz **68** erhalten, die auf einer Goldoberfläche verankert werden kann. Mittels der „Surface Plasmon Resonance (SPR)“ Spektroskopie werden die Bindungseigenschaften dieses immobilisierten Liganden mit verschiedenen Oligonukleotiden untersucht. Es konnte jedoch keine Wechselwirkung detektiert werden. Als Erklärung wird eine mögliche Erniedrigung der Bindungskonstante von **68** mit dDNS infolge der Immobilisierung des Liganden auf der Oberfläche angeführt. Auch ist es denkbar, dass sich die kovalent verankerten Ketten parallel zur Goldschicht anordnen, wodurch eine Bindung verhindert werden würde.

Die Verknüpfung des heteroaromatischen *N*-Methylpyrrol-Oligoamids **73** mit dem Cyclen-Derivat **76** liefert nach Umsetzung mit einem Kobalt(III)-Salz den potentiell sequenzspezifisch dDNS-hydrolysierenden Komplex **81-OH**. Die Verwendung eines Phenyl-Spacers soll dabei den von *M. Rödel* und *M. Pelka* diskutierten Verlust der Hydrolyse-Aktivität in einer analogen Verbindung durch Koordination einer Carbonyl-Funktion der Oligoamid-Kette an das Metall-Zentrum verhindern.

Die Immobilisierung von Zn(II)-Cyclen auf einer polymeren Trägermatrix liefert das funktionalisierte Harz **84**, das eine Erkennung von Naturstoffen mit Imid-Einheiten ermöglicht. Es wird gezeigt, dass sich dieses Polymer zur Bindung der Flavin-Derivate

Vitamin B 2 (Riboflavin) und Riboflavintetraacetat eignet. In wässrigen Lösungen erlaubt die Verwendung von **84** eine quantitative Bestimmung von Vitamin B 2.

Die für die medizinische Diagnostik wichtige Substanz Kreatinin kann mit Hilfe des Polymers **84** aus hochverdünnten Lösungen angereichert werden. Nachfolgende Untersuchungen der Bindung dieses Naturstoffs an Zn(II)-Cyclen mittels potentiometrischer Titration liefert eine Bindungskonstante von $\log K = 6.8$ in Wasser. Das Bindungsmotiv wird zudem durch die Röntgenstruktur eines Cokristalls verifiziert.

Im letzten Teil der Arbeit werden Oligoamide aus Pyrazolaminosäuren aufgebaut und ihre Fähigkeit zur Wechselwirkung mit kleinen Peptiden getestet. Der Ansatz basiert auf den Untersuchungen von *Schrader* und Mitarbeitern, die in unpolaren Lösungsmitteln eine definierte Wechselwirkung von Aminopyrazol mit Peptiden nachweisen konnten. Dazu wird eine künstliche Pyrazolaminosäure mit 3, 5-Substitutionsmuster synthetisiert, die zu längeren Sequenzen verknüpft werden kann. Die Darstellung des kupplungsfähigen Monomers **90** mit freiem Ringstickstoff gelingt in einer dreistufigen Synthese mit einer Gesamtausbeute von 79 %. Das gewünschte 3, 5-Substitutionsmuster der beiden Funktionalitäten wird durch eine Röntgenstruktur verifiziert. Bei der nachfolgenden Kupplung der geeignet modifizierten Bausteine **90** und **92** können allerdings keine dimeren Struktur motive isoliert werden. Auch die Verwendung natürlicher Aminosäuren als Spacer zwischen den Pyrazol-Einheiten führt nicht zum Ziel.

Demgegenüber kann das Pyrazolaminosäure-Dipeptid **102** in einer schutzgruppenfreien Synthese unter Verwendung von Polyethylenglycol Monomethylether (MeO-PEG) als Trägermaterial dargestellt werden. Das Produkt wird ausgehend von dem leicht zugänglichen 3-Nitropyrazol-5-carbonsäurechlorid **98** in einer Gesamtausbeute von 85 % über vier Stufen erhalten.

Um einen effektiven Zugang zu chiralen Pyrazol-Oligoamiden zu erhalten, wird im abschließenden Teil dieser Arbeit ein Festphasenprotokoll entwickelt. Als Monomer kommt die am Ringstickstoff sowie am *N*-Terminus geschützte Pyrazolaminosäure **107** zum Einsatz. Die künstlichen Bausteine werden zum einen direkt, zum anderen mit natürliche Aminosäuren verknüpft. Alle Schritte der Synthese werden in einem Peptidsyntheseautomaten durchgeführt, die Aufreinigung erfolgt mittels semi-präparativer HPLC. Neben den verknüpften Peptiden **110** und **111** wird der Rezeptor **120** mit Pinzettenstruktur aufgebaut, der eine zusätzliche Bindungsstelle für Carboxylatgruppen *C*-terminal ungeschützter Peptide besitzt.

Die Untersuchung der Bindungseigenschaften erfolgt zum einen mittels ^1H -NMR-Titration, zum andern durch Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie. Als Peptide werden die synthetisierten hexameren Derivate **112** und **121** verwendet. Es konnte jedoch keine Bindung detektiert werden. Als Erklärungsmöglichkeit wird im Falle der ^1H -NMR-Titration das für ein vollständiges Lösen der Rezeptoren nötige DMSO diskutiert. Infolge einer starken Koordination dieses Lösungsmittels an die Amid-Funktionen des Peptids wird eine mögliche Bindung des Rezeptors verhindert. Demgegenüber ist eine eventuelle Wechselwirkung in dem bei CD-Messungen in Acetonitril verwendeten Konzentrationsbereich zu schwach, um Änderungen in den Ausgangsstrukturen zu induzieren.

Um die synthetisierten Oligoamide in organischen Lösungsmitteln oder aber in Wasser besser löslich zu machen, müssen nun weitere funktionelle Gruppen eingeführt werden. Mittels der etablierten Festphasensynthese sind derartige Strukturvariationen leicht durchführbar.

D Experimenteller Teil

1 Allgemeines

1.1 Spektroskopie

IR-Spektren

Bio-Rad FT-IR-Spektrometer FTS 155.

NMR-Spektren

- Bruker AC-250 (^1H : 250.1 MHz, ^{13}C : 62.9 MHz), Messtemperatur: 24 °C.
- Bruker Avance 300 (^1H : 300.1 MHz, ^{13}C : 75.5 MHz), Messtemperatur: 27 °C.
- Bruker ARX-400 (^1H : 400.1 MHz, ^{13}C : 100.6 MHz), Messtemperatur: 21 °C.
- Bruker Avance 400 (^1H : 400.1 MHz, ^{13}C : 100.6 MHz), Messtemperatur: 27 °C.
- Bruker Avance 600 (^1H : 600.1 MHz, ^{13}C : 150.1 MHz), Messtemperatur: 27 °C.

Die chemischen Verschiebungen sind in δ -Werten (ppm) relativ zu TMS als internem Standard angegeben. Die Auswertung erfolgt soweit möglich nach erster Ordnung.

Angabemodus: Chemische Verschiebung (Multiplizität, Anzahl der Protonen, Kopplungskonstante, Zuordnung).

Abkürzungen: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br = breit.

Genauigkeit der Angabe: chemische Verschiebung i.d.R. 0.01 ppm sowohl bei ^1H -NMR als auch bei ^{13}C -NMR; Kopplungskonstante: 0.1 Hz.

Bei jedem Spektrum ist das verwendete Lösungsmittel vermerkt.

UV/Vis-Spektren

Cary BIO 50 UV/Vis/NIR-Spektrophotometer der Firma Varian.

Verwendet werden 1 cm-Quarzküvetten der Firma Hellma sowie Uvasol-Lösungsmittel der Firmen Acros und Aldrich. Angabemodus: λ_{max} in nm (ϵ)

Polarimetrie

Polarimeter PE 241 der Firma Perkin-Elmer.

Die Länge der Messküvette beträgt 10 cm. Verwendet werden Uvasol-Lösungsmittel der Firmen Acros und Aldrich. In der Regel wird die Messung mit Licht der Wellenlänge 589 nm durchgeführt.

Angabemodus: $[\alpha]_D^{20}$ in $\left[\frac{^\circ \cdot ml}{g \cdot dm} \right]$, c in $\left[\frac{g}{100 ml} \right]$

Circulardichroismus-Spektren

Jasco-Elmer PE 241 Polarimeter.

Verwendet werden 1 cm- und 2 cm-Quarz-Rundküvetten der Firma Helma sowie Uvasol-Lösungsmittel der Firmen Acros und Aldrich.

Massenspektren

- Varian CH-5 (EI)
- Finnigan MAT 95 (CI; FAB und FD)
- Finnigan MAT TSQ 7000 (ESI)

Bei FAB dient Xenon als Ionisationsgas. Die Matrix ist jeweils aufgeführt.

1.2 Analytik

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden mit einer Apparatur nach Tottoli der Firma Büchi bestimmt und sind unkorrigiert.

Elementaranalysen

Mikroanalytisches Labor des Fachbereichs Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg.

HPLC

- Analytische HPLC: LC-System HP1090M mit DA-Detektor, Chromatographiesäule: Phenomenex Luna C18 (3 μ m, 15 mm, 4.6 mm);
- Semipräparative HPLC: LC-System Knauer HPLC Pump K-1001 mit UV-Detektor K-2600, Chromatographiesäule: Phenomenex Luna C18 (10 μ m, 250 mm, 21.2 mm),
- HPLC-MS: LC-System Agilent 1100 mit MS-Detektor Finnigan MAT TSQ 7000 (ESI); Chromatographiesäule: Phenomenex Luna C18 (3 μ m, 15 mm, 2.0 mm) und Phenomenex Luna C18 (3 μ m, 15 mm, 4.6 mm);

Die analytischen Retentionszeiten werden bei einem Fluss von 1 ml/min ermittelt. Präparationen werden bei Flüssen von 10 ml/min durchgeführt.

Als Eluenten kommen sowohl bei der analytischen als auch bei der semipräparativen HPLC lineare Gradienten aus Acetonitril und Wasser zum Einsatz, die 0.075 Gew.% TFA (Methoden 1 und 2) bzw. 0.006 Gew.% TFA (Methode 3) enthalten.

1.3 Synthese

Säulenchromatographie

Kieselgel Merck Geduran SI 60.

Dünnschichtchromatographie

Aluminiumfolien Merck 60 F₂₅₄ Kieselgel, Schichtdicke 0.2 mm.

Lösungsmittel

Reinigung und Trocknung nach den üblichen Verfahren.²⁷⁴

Wenn nicht anders vermerkt, werden handelsübliche Qualitäten eingesetzt.

1.4 Quantenmechanische Berechnungen

Alle Molekülgeometrien werden mit dem Programm Spartan durchgeführt.²⁷⁵ Nach Vorooptimierung durch Kraftfeldrechnung (MMFF) werden die entsprechenden Energieminima auf semiempirischem Niveau mittels PM3-Rechnungen²⁷⁶ ermittelt.

1.5 Messmethoden

Potentiometrische Titration

Die potentiometrischen pH-Titrationen werden in wässriger 0.1 M TEAP-Lsg. durchgeführt, um eine konstante Ionenstärke von $I = 0.1$ zu gewährleisten. Als Base dient 0.1 M Tetraethylammoniumhydroxid, welches mit Hilfe eines Dosimats (Dosimat 665 bzw. 765, Metrohm) zu der auf 25°C thermostatisierten Messlösung gegeben wird. Der pH Wert wird mit einem Microprocessor pH-Meter (pH 3000) der Firma WTW (Wiss.-techn. Werkstätten, Weilheim) gemessen. Die Base wird in regelmäßigen Abständen mit Natriumphthalat geeicht. Die Eigendissoziation des Wassers ($\log K_w$) wird durch Titration von 0.1 M Perchlorsäure bestimmt.

Die Auswertung erfolgt mit dem Computerprogramm Hyperquad 2000 (Version 2.1).²⁷⁷

¹H-NMR Titration

Alle NMR-Titrationen werden bei einer Messfrequenz von 500 MHz in einer Argon-Atmosphäre unter Verwendung getrockneter Lösungsmittel durchgeführt.

Dazu wird das jeweilige Peptid ($c \approx 1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$) vorgelegt und nachfolgend werden 1.52 eq. an Pyrazol-Oligoamid schrittweise zugegeben..

Die Auswertung erfolgt durch nicht-lineare Regression^{253,254} der erhaltenen Messwerte mit dem PC-Programm SigmaPlot 2000.

Röntgenstrukturanalyse

Cokristall aus Zn(II)-Cyclen und Kreatinin

$\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{OZn}$, 2 ClO_4 , H_2O ; $M = 574.59 \text{ g/mol}$, orthorhombisch, Raumgruppe Pbca , $a = 12.4683 (7) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $b = 29.6664 (15) \text{ \AA}$, $\beta = 90^\circ$, $c = 12.4080 (5) \text{ \AA}$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 4.5896 \text{ nm}^3$, $Z = 8$, $D_x = 1.663 \text{ Mg/m}^3$, $\lambda (\text{Mo-K}\alpha) = 71.073 \text{ pm}$, $\mu = 1.368 \text{ mm}^{-1}$, $F(000) = 2380$, $T = 297 (2) \text{ K}$. Ein farbloser, flacher Kristall mit den Maßen $0.48 \times 0.45 \times 0.05 \text{ mm}$ wurde verwendet, um auf einem STOE-IPDS Diffraktometer eine Gesamtzahl von 35813 Reflexen (4147 unabhängige Reflexe, $R_{\text{int}} = 0.0538$) von 2.14° bis 25.30° zu messen.

Die Struktur wurde durch direkte Methoden gelöst (SIR97)²⁷⁸ und der F^2 -Wert mit dem Programm SHELXL-97²⁷⁹ für alle nicht-Wasserstoff-Atome verfeinert. Die Position der Wasserstoffatome wurde rechnerisch ermittelt. Der endgültige $\omega R(F^2)$ -Wert für alle Reflexe betrug 0.1386; $R(F) = 0.0555$, $S = 1.063$, max. $\Delta\rho = 525 \text{ e}\cdot\text{nm}^{-3}$.

5-Amino-pyrazol-1, 3-dicarbonsäure-3-ethylester-1-methylester (90)

$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4$; $M = 213.20 \text{ g/mol}$, triklinisch, Raumgruppe P1 , $a = 6.3241(7) \text{ \AA}$, $\alpha = 93.687(14)^\circ$, $b = 6.4956(8) \text{ \AA}$, $\beta = 96.857(13)^\circ$, $c = 12.4132(15) \text{ \AA}$, $\gamma = 95.235(14)^\circ$, $V = 0.5027 \text{ nm}^3$, $Z = 2$, $D_x = 1.408 \text{ Mg/m}^3$, $\lambda (\text{Mo-K}\alpha) = 71.073 \text{ pm}$, $\mu = 0.114 \text{ mm}^{-1}$, $F(000) = 224$, $T = 173 (1) \text{ K}$. Ein farbloser, nadelförmiger Kristall mit den Maßen $0.70 \times 0.12 \times 0.06 \text{ mm}$ wurde verwendet, um auf einem STOE-IPDS Diffraktometer eine Gesamtzahl von 4238 Reflexen (1567 unabhängige Reflexe, $R_{\text{int}} = 0.0380$) von 3.16° bis 25.73° zu messen.

Die Struktur wurde durch direkte Methoden gelöst (SIR97)²⁷⁸ und der F^2 -Wert mit dem Programm SHELXL-97²⁷⁹ für alle nicht-Wasserstoff-Atome verfeinert. Die Position

der Wasserstoffatome wurde rechnerisch ermittelt. Der endgültige $\omega R(F^2)$ -Wert für alle Reflexe betrug 0.0754; $R(F) = 0.0560$, $S = 0.905$, max. $\Delta\rho = 158 \text{ e}\cdot\text{nm}^{-3}$.

2 Synthese

2.1 Allgemeine Versuchsvorschriften

2.1.1 Festphasensynthese von unnatürlichen Oligopeptiden nach der Boc-Schutzgruppenstrategie (AAV1)

- **Peptid Festphasensynthese**

Als Festphase kommt das Boc- β -Alanin-Pam-Harz (maximale Belegung etwa 0.2 mmol/g Harz) zum Einsatz.¹⁴⁴

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe am Harz sowie die Kupplung der ersten Boc-geschützten Aminosäure erfolgt nach folgendem Schema:

	Operation	Reagentien (6 ml / g Harz)	Zeit [min]	Anzahl
1	Quellung	DMF	10	1
2	Entschützen	80 % TFA/CH ₂ Cl ₂ , 0.4 M PhOCH ₃	5	1
3	Waschen	CH ₂ Cl ₂		1
4	Entschützen	80 % TFA/CH ₂ Cl ₂ , 0.4 M PhOCH ₃	20	1
5	Waschen	CH ₂ Cl ₂		2
	Schütteln	CH ₂ Cl ₂	3	1
	Waschen	DMF		1
	Schütteln	DMF	3	1
6	Kuppeln	Boc-Py-OBt, DIEA, DMF	180	1
7	Waschen	DMF		1
	Schütteln	DMF	3	1
	Waschen	CH ₂ Cl ₂		2
8	Trocknen	Hochvakuum		

Der Belegungsgrad wird gravimetrisch nach folgender Formel bestimmt:²⁸⁰

$$N = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 1000}{MG_X \cdot m_2}$$

N = Harzbelegung [mmol/g]
 MG_X = Masse des neu hinzukommenden Fragments [g/mol]
 m_2 = Harzgewicht nach Belegung
 m_1 = Harzgewicht vor Belegung

• Peptid-Festphasensynthese

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe der harzgebundenen Aminosäure bzw. des harzgebundenen Peptids sowie die Kupplung einer weiteren Boc-geschützten Aminosäure erfolgt nach folgendem Schema:²⁸¹

	Operation	Reagentien (6 ml / g Harz)	Zeit [min]	Anzahl
1	Quellung	DMF	10	1
2	Entschützen	80 % TFA/CH ₂ Cl ₂ , 0.4 M PhOCH ₃	5	1
3	Waschen	CH ₂ Cl ₂	3	1
4	Entschützen	80 % TFA/CH ₂ Cl ₂ , 0.4 M PhOCH ₃	20	1
5	Waschen	CH ₂ Cl ₂		2
	Schütteln	CH ₂ Cl ₂	3	1
	Waschen	DMF		1
	Schütteln	DMF	3	1
6	Kuppeln	a) Boc-Py-OBt, DIEA, DMF oder b) Boc-AS-OH, HBTU, DIEA, DMF	240 120	1 1
7	Waschen	DMF		1
	Schütteln	DMF	3	1
8	Waschen	CH ₂ Cl ₂	3	2
9	Trocknen	Hochvakuum		

Die Schritte 9 und 10 werden nur durchgeführt, wenn die Peptid-Festphasensynthese für mehrere Tage unterbrochen wird oder beendet ist.

Die Kupplung der Boc-Aminosäuren erfolgt nach folgenden Methoden:

- a) 5.5 eq Boc-Py-OBt und 16.5 eq DIEA werden in DMF gelöst und zum *N*-terminal entschützten Peptidyl-Harz gegeben;
- b) 11 eq Boc-AS-OH, 11 eq HBTU und 32 eq DIEA werden in DMF gelöst und zum *N*-terminal entschützten Peptidyl-Harz gegeben.

- **Peptidabspaltung vom Pam-Harz**²⁸²

Das peptidbeladene Harz wird nach Zugabe von Dimethylaminopropylamin (etwa 4 ml/g Harz) 18 h bei 55 °C gerührt. Nach Abfiltrieren der festen Phase wird die Reaktionsmischung mit 10 ml H₂O verdünnt und mittels semipräparativer HPLC gereinigt. Die vereinigten Fraktionen werden, nach Entfernen des Acetonitrils im Rotationsverdampfer, lyophilisiert.

2.1.2 Festphasensynthese von Peptiden nach der Fmoc-Schutzgruppenstrategie (AAV2)

• Kupplung von Fmoc-geschützter Aminosäure an Sieber Amid-Harz

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Harz bzw. die Anknüpfung der ersten Aminosäure an das *Sieber* Amid-Harz (maximale Belegung etwa 0.2 mmol/g Harz) wird wie folgt durchgeführt:

	Operation	Reagentien (8 ml / g Harz)	Zeit [min]	Anzahl
1	Quellung	CH ₂ Cl ₂	30	1
2	Waschen	NMP		1
3	Entschützen	20 % Piperidin in NMP	20	1
4	Waschen	NMP		1
5	Entschützen	20 % Piperidin in NMP	20	1
6	Waschen	CH ₂ Cl ₂		2
	Schütteln	CH ₂ Cl ₂	3	1
	Waschen	DMF		1
	Schütteln	DMF	3	1
7	Kuppeln	5 eq Fmoc-AS, 5 eq HOBt, 5 eq DIPCDI, NMP	360	1
8	Waschen	NMP		1
9	Kuppeln	5 eq Fmoc-AS, 5 eq HOBt, 5 eq DIPCDI, NMP	360	1
10	Waschen	NMP		1
	Schütteln	NMP	3	1
	Waschen	CH ₂ Cl ₂		2
11	Trocknen	Hochvakuum		

Der Belegungsgrad wird gravimetrisch nach oben bereits angegebener Formel bestimmt.²⁸⁰

• Peptid-Festphasensynthese

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe der harzgebundenen Aminosäure bzw. des harzgebundenen Peptids und die Kupplung einer weiteren Fmoc-Aminosäure erfolgt nach folgendem Schema:

	Operation	Reagentien (8 ml / g Harz)	Zeit [min]	Anzahl
1	Quellung	CH ₂ Cl ₂	30	1
2	Waschen	NMP		1
3	Entschützen	20 % Piperidin in NMP	20	1
4	Waschen	NMP		1
5	Entschützen	20 % Piperidin in NMP	20	1
6	Waschen	CH ₂ Cl ₂		2
	Schütteln	CH ₂ Cl ₂	3	1
	Waschen	NMP		1
	Schütteln	NMP	3	1
7	Kuppeln	Fmoc-AS, HATU, HOAt, Collidin, NMP oder Fmoc-AS, TBTU, HOBt, DIEA, NMP	420	1
8	Waschen	NMP		1
9	Kuppeln	Fmoc-AS, HATU, HOAt, Collidin, NMP oder Fmoc-AS, TBTU, HOBt, DIEA, NMP	420	1
10	Waschen	NMP		1
	Schütteln	NMP	3	1
11	Waschen	CH ₂ Cl ₂	3	2
12	Trocknen	Hochvakuum		

Die Schritte 11 und 12 erfolgen nur, wenn die Peptid-Festphasensynthese für mehrere Tage unterbrochen wird oder beendet ist.

Die Kupplung der Fmoc-Aminosäuren erfolgt entweder mit HATU oder TBTU²⁸³ nach folgender Methode:

Je 3 eq geschützter Fmoc-Aminosäure, 3.3 eq Kupplungsreagens, 3.3 eq Additiv (HOAt bzw. HOBt), 30 eq Collidin (bei HATU) und 8.4 eq DIEA (bei TBTU) werden in NMP gelöst, zum *N*-terminal entschützten Peptidyl-Harz gegeben und 420 min geschüttelt.²⁸⁴

- **Acetylierung der freien Aminogruppe einer endständigen harzgebundenen Aminosäure**

1.00 g des Harzes (Beladung etwa 0.2 mmol/g) werden zweimal jeweils 30 min mit einer Lösung von 190 μ l (2.0 mmol, 10 eq) Ac_2O und 68 μ l (0.2 mmol, 1 eq) DIEA in 3 ml CH_2Cl_2 geschüttelt. Nach Evakuieren der Lösung wird dreimal mit CH_2Cl_2 gewaschen.

- **Peptidabspaltung vom Sieber Amid-Harz**

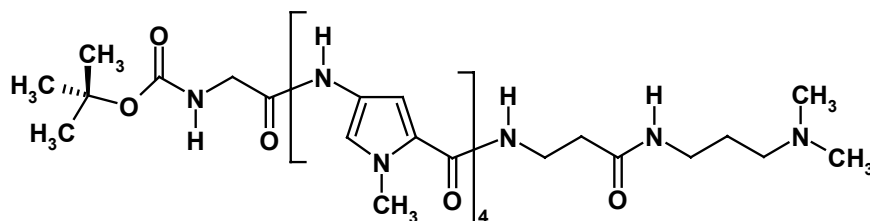
Das peptidbeladene Sieber Amid-Harz wird in eine Kunststoffspritze mit eingelegtem Filterplättchen überführt und 10 min in CH_2Cl_2 gequollen. Anschließend wird TFA in CH_2Cl_2 (2 % v/v, 8 ml/g Harz) zugegeben und 5 min geschüttelt. Die Peptidabspaltung wird acht- bis zehnmal wiederholt und die vereinigten Filtrate am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Der erhaltene Feststoff wird in wenig CH_2Cl_2 gelöst, intensiv im Ultraschallbad behandelt und durch Zugabe von Et_2O wieder ausgefällt. Nach Absaugen wird das Rohprodukt im Hochvakuum getrocknet und mittels Säulenchromatographie oder semipräparativer HPLC gereinigt.

2.1.3 pMB-Entschützung von Pyrazol-Oligoamiden (AAV 3)

Das pMB-geschützte Peptidamid wird in wenig absoluter TFA gelöst und unter Argonatmosphäre innerhalb von etwa 20 min auf 70-72 °C erwärmt. Es wird 5 min bei dieser Temperatur belassen und anschließend das Lösungsmittel abgezogen. Der erhaltene Feststoff wird in wenig CH_2Cl_2 gelöst, intensiv im Ultraschallbad behandelt und durch Zugabe von Et_2O wieder ausgefällt. Nach Absaugen wird das Rohprodukt im Hochvakuum getrocknet und mittels semipräparativer HPLC gereinigt. Die vereinigten Fraktionen werden, nach Entfernen des Acetonitrils im Rotationsverdampfer, lyophilisiert.

2.2 Darstellung der Verbindungen

Boc-Gly-(Py)₄-β-Dp (66)



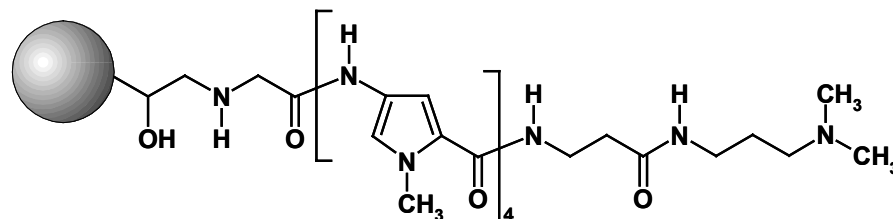
Durchführung analog AAV1.

Peptidsynthese-Ansatz:

900mg (0.18 mmol) Boc-β-Alanin-Pam-Harz.

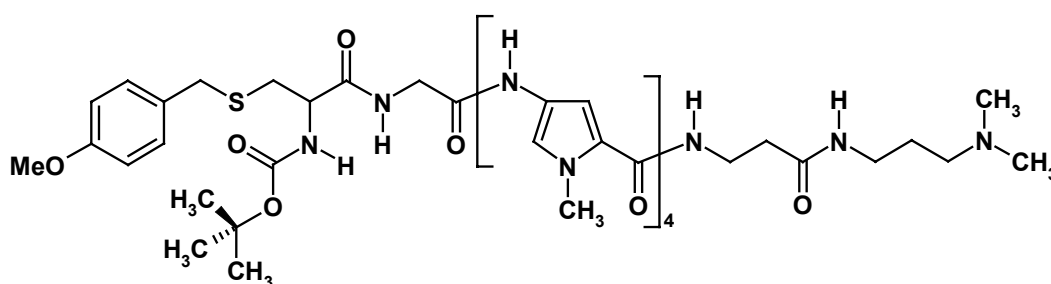
Es werden 123 mg (0.15 mmol, 81 %) der Verbindung **66** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Schmpkt.: 212 °C; **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3441, 2924, 1645, 1549, 1436, 1259; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{\max} [nm] (lg ε) = 239 (3.50), 308 (3.54); **¹H-NMR** (250 MHz, CD₃CN/D₂O, TMS): δ [ppm] = 1.36 (s, 9 H, CH₃-Boc), 1.51-1.75 (m, 2 H, CH₂), 2.18 (s, 6 H, CH₃-Dp), 2.32-2.47 (m, 4 H, 2 CH₂), 3.08 (t, 2 H, ³J = 6.7 Hz, CH₂), 3.44 (t, 2 H, ³J = 6.7 Hz, CH₂), 3.69-3.74 (m, 5 H, CH₂, CH₃-Pyrrol), 3.75-3.79 (m, 9 H, CH₃-Pyrrol), 6.90 (d, 1 H, ⁴J = 2.0 Hz, CH-Pyrrol), 6.78 (br, 1 H, CH-Pyrrol), 6.83 (br, 2 H, CH-Pyrrol), 7.06 (d, 1 H, ⁴J = 2.0 Hz, CH-Pyrrol), 7.10 (d, 1 H, ⁴J = 2.0 Hz, CH-Pyrrol), 7.12-7.15 (m, 2 H, CH-Pyrrol); **¹³C-NMR** (62 MHz, CD₃CN/D₂O, TMS): δ [ppm] = 25.03 (-), 28.61 (+), 36.64 (-), 36.77 (-), 36.86 (-), 36.99 (+), 37.11 (+), 37.15 (+), 37.18 (+), 43.62 (+), 44.57 (-), 56.19 (-), 81.52 (C_{quart}), 105.97 (+), 106.05 (+), 120.01 (+), 120.37 (+), 121.64 (+), 121.79 (+), 122.28 (C_{quart}), 122.31 (C_{quart}), 122.36 (C_{quart}), 122.43 (C_{quart}), 123.60 (C_{quart}), 123.65 (C_{quart}), 123.74 (C_{quart}), 123.81 (C_{quart}), 158.20 (C_{quart}), 160.61 (C_{quart}), 160.67 (C_{quart}), 160.80 (C_{quart}), 163.84 (C_{quart}), 169.75 (C_{quart}), 174.92 (C_{quart}); **MS** (ESI, CH₃CN + 1% AcOH): m/z (%) = 819 (100) [MH]⁺.

Fractogel-Gly-(Py)₄-β-Dp (67)

115 mg (0.14 mmol) Boc-Gly-(Py)₄-β-Dp (**66**) werden in 5 ml 80 %iger TFA:CH₂Cl₂ 30 min bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt und der orange Feststoff in 20 ml wässrigem Carbonatpuffer (pH 10) suspendiert. Nach Zugabe von 500 mg Fractogel[®] EMD Epoxy wird unter Rühren (KPG-Rührer) 4 Tage auf 40 °C erwärmt. Die Polymer-Oligoamid-Spezies wird abgesaugt und zur Deaktivierung nicht umgesetzter Epoxidgruppen 2 h bei 40 °C in 20 ml Tris/HCl-Puffer (pH 8), der 0.2 mol/l Glycin enthält, gerührt. Nach erneutem Absaugen wird das funktionalisierte Polymer über Nacht bei 50 °C im Hochvakuum getrocknet. **67** wird in Form eines gelben Feststoffs (520 mg) erhalten.

Elementaranalyse: C 52.45, H 7.52, N 3.70.

Boc-Cys(Mob)-Gly-(Py)₄-β-Dp (68):

Durchführung analog AAV1.

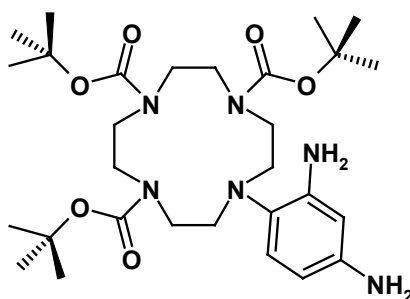
Peptidsynthese-Ansatz:

900mg (0.18 mmol) Boc-β-Alanin-Pam-Harz.

Es werden 156 mg (0.15 mmol, 85 %) der Verbindung **68** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten

Schmpkt.: 187 °C; **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3441, 2361, 1647, 1541, 1466, 1255; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{max} [nm] (lg ϵ) = 231 (3.70), 309 (3.68); **¹H-NMR** (250 MHz, CD₃CN/D₂O, TMS): δ [ppm] = 1.42 (s, 9 H, CH₃-Boc), 1.79-1.89 (m, 2 H, CH₂), 2.48 (t, 2 H, ³J = 6.8 Hz), 2.70-2.80 (m, 8 H, CH₃-Dp, CH₂), 2.86-2.93 (m, 1 H, CH), 2.98-3.04 (m, 2 H, CH₂), 3.20-3.25 (t, 2 H, ³J = 6.6 Hz, CH₂), 3.52 (t, 2 H, ³J = 6.8 Hz, CH₂), 3.74 (m, 5 H, OCH₃, CH₂), 3.80 (s, 3 H, CH₃-Pyrrol), 3.81 (s, 3 H, CH₃-Pyrrol), 3.84 (s, 3 H, CH₃-Pyrrol), 3.85 (s, 3 H, CH₃-Pyrrol), 3.94 (bs, 2 H, CH₂), 6.80 (d, 1 H, ⁴J = 1.9 Hz, CH-Pyrrol), 6.82-6.84 (m, 1 H, CH-Pyrrol), 6.85-6.89 (m, 2 H, CH-aromatisch Benzyl), 6.90 (d, 1 H, ²J = 1.9 Hz, CH-Pyrrol), 6.92 (d, 1 H, ²J = 1.9 Hz, CH-Pyrrol), 7.10 (d, 1 H, ⁴J = 1.9 Hz, CH-Pyrrol), 7.14-7.16 (m, 1 H, CH-Pyrrol), 7.18-7.20 (m, 2 H, CH-Pyrrol), 7.24-7.28 (m, 2 H, CH-aromatisch Benzyl); **¹³C-NMR** (100 MHz, CD₃CN/D₂O, TMS): δ [ppm] = 25.06 (-), 28.47 (+, 3 C), 33.85 (-), 36.02 (-), 36.51 (-), 36.68 (-), 36.69 (-), 36.88 (+), 36.91 (+), 36.99 (+), 37.02 (+), 43.52 (-), 43.49 (+), 55.02 (+), 55.92 (+), 56.06 (-), 81.43 (C_{quart}), 105.80 (+), 105.92 (+), 114.86 (+), 120.36 (+), 120.51 (+), 120.53 (+), 120.59 (+), 122.27 (C_{quart}), 122.31 (C_{quart}), 122.36 (C_{quart}), 122.43 (C_{quart}), 123.53 (C_{quart}), 123.66 (C_{quart}), 123.77 (C_{quart}), 123.94 (C_{quart}), 130.95 (C_{quart}), 131.08 (+), 157.47 (C_{quart}), 159.42 (C_{quart}), 160.39 (C_{quart}), 160.56 (C_{quart}), 160.67 (C_{quart}), 163.64 (C_{quart}), 168.24 (C_{quart}), 173.56 (C_{quart}), 174.73 (C_{quart}); **MS** (ESI, CH₃CN + 1% AcOH): m/z (%) = 1042 (81) [MH]⁺, 521 (100) [M+2H]²⁺.

10-(2,4-Diamino-phenyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tert-butylester (77)

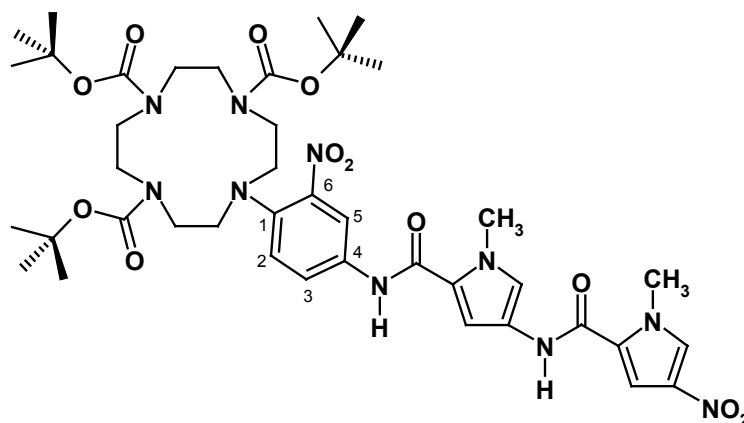


1.00 g der Dinitroverbindung **75** werden in 10 ml EtOH gelöst und nach Zugabe von etwa 50 mg Pd/C (10 % Pd) in einer Wasserstoff-Atmosphäre (5 bar) 48 h bei RT

gerührt. Anschließend wird der Katalysator über Celite[®] abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert und der erhaltene Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: PE:EE = 20:80, R_f = 0.25, EE:PE = 1:1). Es werden 668 mg (1.16 mmol, 74 %) eines leicht gelben Feststoffs isoliert.

Schmpkt.: 110 °C (Zersetzung); **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 2976, 2930, 1685, 1529, 1478, 1417, 1366, 1249, 1168; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{\max} [nm] (lg ϵ) = 217(4.39), 307 (3.49); **¹H-NMR** (MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 2.81-3.16 (m, 4 H, CH₂-Cyclen), 3.18-3.41 (m, 4 H, CH₂-Cyclen), 3.43-3.82 (m, 8 H, CH₂-Cyclen), 6.02-6.07 (m, 2 H, CH-aromatisch Phenyl), 6.78 (d, 1 H, ³J = 7.9 Hz, CH-aromatisch Phenyl); **¹³C-NMR** (62 MHz, DMSO-d₆, TMS), δ [ppm] = 79.83 (C_{quart}), 102.78 (+), 105.01 (+), 122.22 (+), 128.94 (C_{quart}), 143.85 (C_{quart}), 155.77 (C_{quart}), 156.27 (C_{quart}); **MS** (ESI, MeOH + 1 % AcOH): m/z (%) = 579 (100) [MH]⁺.

10-[4-({1-Methyl-4-[(1-methyl-4-nitro-1*H*-pyrrol-2-carbonyl)-amino]-1*H*-pyrrol-2-carbonyl}amino)-2-nitro-phenyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbon-säure-tri-*tert*-butylester (78)

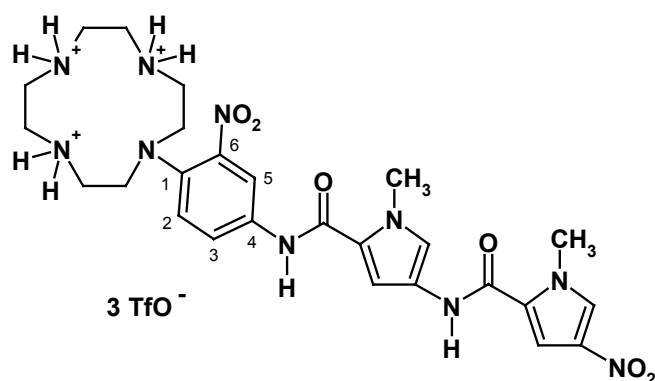


242 mg (0.40 mmol) des Cyclen-Derivates **76**, 128 mg (0.44 mmol) der Säure **73**, sowie 181 mg (0.48 mmol) HATU, 65 mg (0.48 mmol) HOAt und 481 mg (3.98 mmol) Collidin werden in 6 ml DMF gelöst und 48 h bei 60 °C gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 3 ml H₂O verdünnt und mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, es wird vom Trockenmittel abfiltriert und zur Trockne einrotiert. Das erhaltene Rohprodukt wird an Kieselgel mit

EE:PE = 1:1 chromatographiert. Verbindung **78** (198 mg, 0.22 mmol, $R_f = 0.22$ in EE:PE = 70:30) wird in Form eines gelben Feststoffs in 82 %iger Ausbeute isoliert.

Schmpkt.: 186 °C (Zersetzung); **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3460, 2927, 1668, 1504, 1419, 1367, 1167, 850; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{\max} [nm] (lg ϵ) = 201 (sh, 4.67), 238 (4.36), 272 (sh, 4.42) 307 (4.52); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.43 (s, 18 H, CH₃-Boc), 1.46 (s, 9 H, CH₃-Boc), 3.19-3.27 (m, 4 H, CH₂-Cyclen), 3.34-3.41 (m, 4 H, CH₂-Cyclen), 3.42-3.49 (m, 4 H, CH₂-Cyclen), 3.50-3.58 (m, 4 H, CH₂-Cyclen), 3.95 (s, 3 H, CH₃-Pyrrol), 4.05 (s, 3 H, CH₃-Pyrrol), 7.22 (d, 1 H, $^4J = 1.9$ Hz, CH-Pyrrol), 7.33 (d, 1 H, $^4J = 1.7$ Hz, CH-Pyrrol), 7.40 (d, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, 2-H), 7.60 (d, 1 H, $^4J = 1.9$ Hz, CH-Pyrrol), 7.90 (dd, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2.5$ Hz, 3-H), 8.19 (d, 1 H, $^4J = 1.7$ Hz, CH-Pyrrol), 8.30 (d, 1 H, $^4J = 2.5$ Hz, 5-H), 10.17 (bs, 1 H, NH), 10.32 (bs, 1 H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm] = 27.87, 28.03, 36.22, 37.35, 46.29, 47.24, 48.01, 78.51 (C_{quart}), 105.67 (CH-Pyrrol), 107.53 (CH-Pyrrol), 115.44 (5C), 119.66 (CH-Pyrrol), 123.96 (3C), 126.05 (2C), 128.15 (CH-Pyrrol), 121.44, 122.22, 125.55, 133.71, 135.51, 138.92, 154.66, 154.86, 156.78, 159.55 (Carbonyl, C_{quart}); **MS** (ESI, MeOH + 10 mmol NH₄Ac): m/z (%) = 883 (100) [MH]⁺, 391 (78) [MH-C₅H₉O₂]⁺; **HRMS** (C₄₁H₅₈N₁₀O₁₂): ber. 883.4314, gef. 883.4322 \pm 1.19 ppm.

1-[4-({1-Methyl-4-[(1-methyl-4-nitro-1*H*-pyrrol-2-carbonyl)-amino]-1*H*-pyrrol-2-carbonyl}amino)-2-nitro-phenyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-tri-triflat (79)

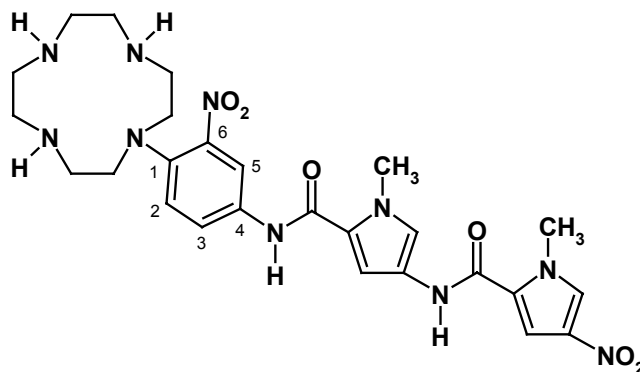


Zur Entfernung der Boc-Schutzgruppen werden 50 mg (0.06 mmol) der Verbindung **78** in 7 ml TFA/CH₂Cl₂ (60:40, v/v) unter wenig Zusatz von Methanol 36 h bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel abgezogen und der erhaltene Feststoff im

Hochvakuum getrocknet. Das Triflat-Salz **79** (52 mg, 0.06 mmol) wird in Form eines gelben Pulvers in quantitativer Ausbeute erhalten.

Schmpkt.: 147-149 °C; **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3430, 2951, 1667, 1515, 1423, 1161; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{max} [nm] (lg ϵ) = 202 (sh, 4.55), 239 (4.45), 273 (4.58), 305 (4.60); **¹H-NMR** (400 MHz, D₂O, TMS): δ [ppm] = 2.92-3.03 (m, 4 H, CH₂-Cyclen), 3.10-3.25 (m, 8 H, CH₂-Cyclen), 3.25-3.36 (m, 4 H, CH₂-Cyclen), 3.58 (s, 3 H, CH₃-Pyrrol), 3.68 (s, 3 H, CH₃-Pyrrol), 6.64 (s, 1 H, HSQC: CH-Pyrrol), 6.89 (s, 1 H, HSQC: CH-Pyrrol), 6.97 (d, 1 H, ⁴*J* = 1.9 Hz, HSQC: CH-Pyrrol), 7.44 (d, 1 H, ⁴*J* = 1.6 Hz, HSQC: CH-Pyrrol), 7.53 (dd, 1 H, ³*J* = 8.9 Hz, ⁴*J* = 1.9 Hz, 3C-H), 7.58 (d, 1 H, ³*J* = 8.9 Hz, 2C-H), 8.01 (d, 1 H, ⁴*J* = 2.3 Hz, 5C-H); **¹³C-NMR** (100 MHz, D₂O, TMS), δ [ppm] = 36.44, 37.55, 41.54, 42.61, 44.61, 49.90, 105.93 (CH-Pyrrol), 108.05 (CH-Pyrrol), 115.64 (CH-Pyrrol), 116.09 (5C), 116.35 (q, ¹*J* = 291.5 Hz, -CF₃), 126.06 (3C), 126.95 (2C), 128.70 (CH-Pyrrol), 120.79, 125.16, 125.66, 133.68, 136.88, 137.60, 146.89, 157.81, 160.52 (Carbonyl, C_{quart}), 162.92 (q, ¹*J* = 291.5 Hz, CO(CF₃)); **MS** (ESI, CH₃CN): *m/z* (%) = 583 (100) [MH]⁺.

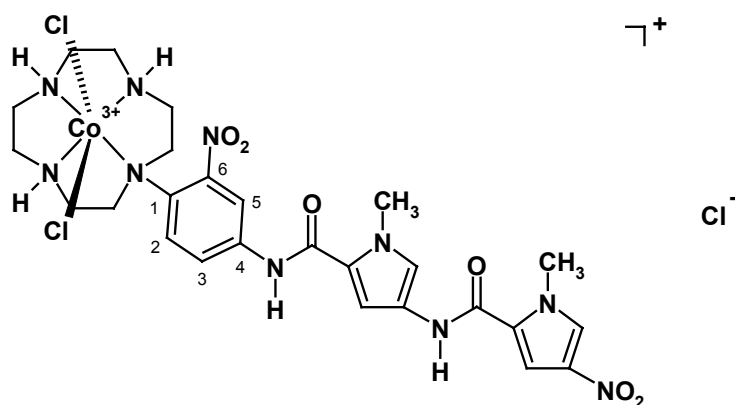
1-[4-({1-Methyl-4-[(1-methyl-4-nitro-1*H*-pyrrol-2-carbonyl)-amino]-1*H*-pyrrol-2-carbonyl}amino)-2-nitro-phenyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (80**)**



118 mg (0.13 mmol) des Eduktes **79** werden in 12 ml H₂O und 1 ml CH₃CN gelöst und über einen stark basischen Ionentauscher gegeben. Das erhaltene Eluat wird vom organischen Lösungsmittel befreit und gefriergetrocknet. Das freie Amin **80** wird als gelber Feststoff in quantitativer Ausbeute (76 mg, 0.13 mmol) isoliert.

Schmpkt.: 156 °C (Zersetzung); **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3441, 2913, 1661, 1506, 1417, 1159; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{max} [nm] (lg ϵ) = 203 (sh, 4.72), 236 (4.54), 279 (4.63), 306 (4.71); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 2.42-2.48 (m, 8 H, CH₂-Cyclen), 2.60-2.66 (m, 4 H, CH₂-Cyclen), 2.96-3.03 (m, 4 H, CH₂-Cyclen), 3.87 (s, 3 H, CH₃-Pyrrol), 3.97 (s, 3 H, CH₃-Pyrrol), 7.21 (d, 1 H, ⁴*J* = 1.9 Hz, HSQC: CH-Pyrrol), 7.33 (d, 1 H, ⁴*J* = 1.7 Hz, HSQC: CH-Pyrrol), 7.60 (d, 1 H, ⁴*J* = 1.9 Hz, HSQC: CH-Pyrrol), 7.61 (d, 1 H, ³*J* = 8.9 Hz, 2C-H), 7.88 (dd, 1 H, ³*J* = 8.9 Hz, ⁴*J* = 2.4 Hz, 3C-H), 8.17 (d, 1 H, ⁴*J* = 2.4 Hz, 5C-H), 8.18 (d, 1 H, ⁴*J* = 1.7 Hz, HSQC: CH-Pyrrol), 10.19 (bs, 1 H, NH), 10.34 (bs, 1 H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, TMS), δ [ppm] = 36.21, 37.35, 44.98, 45.40, 46.51, 52.02, 105.80 (CH-Pyrrol), 107.53 (CH-Pyrrol), 114.25 (5C), 119.74 (CH-Pyrrol), 123.92 (3C), 126.97 (2C), 128.14 (CH-Pyrrol), 121.56, 122.22, 126.11, 133.70, 136.21, 139.04, 147.81, 156.88, 159.67 (Carbonyl, C_{quart}); **MS** (ESI, CH₃CN): *m/z* (%) = 583 (100) [MH]⁺.

1-[4-({1-Methyl-4-[(1-methyl-4-nitro-1*H*-pyrrol-2-carbonyl)-amino]-1*H*-pyrrol-2-carbonyl}amino)-2-nitro-phenyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-cobalt(III)-trichlorid (81-Cl)

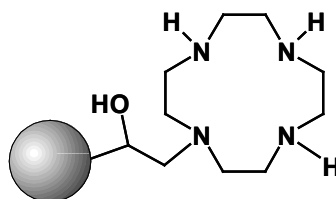


20 mg (0.03 mmol) der Verbindung **80** werden in 6 ml H₂O/MeOH (1:1) gelöst und nach Zugabe von 12 mg (0.03 mmol) Na₃[Co(CO₃)₂]•3H₂O 30 min auf 70 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT werden 5 bis 7 Tropfen konzentrierte HCl zugetropft, wobei ein Farbumschlag nach gelblich-grün zu beobachten ist. Nach Entfernen des organischen Lösungsmittels wird die wässrige Phase gefriergetrocknet. Der Kobalt(III)-Cyclen

Komplex **81-Cl** wird in Form eines gelblich-grünen Feststoffs in quantitativer Ausbeute (25 mg, 0.03 mmol) isoliert.

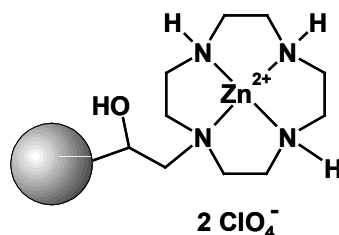
Schmpkt.: 177-179 °C; **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3437, 2934, 1668, 1549, 1093, 740; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{max} [nm] (lg ϵ) = 298 (3.90); **¹H-NMR** (400 MHz, D₂O, TMS): δ [ppm] = 2.97-3.06 (m, 4 H, CH₂-Cyclen), 3.13-3.28 (m, 8 H, CH₂-Cyclen), 3.29-3.41 (m, 4 H, CH₂-Cyclen), 3.56 (s, 3 H, CH₃-Pyrrol), 3.56 (s, 3 H, CH₃-Pyrrol), 6.77 (bs, 1 H, CH), 6.87 (bs, 1 H, CH), 7.09 (bs, 1 H, CH), 7.48 (bs, 1 H, CH), 7.60 (bs, 2 H, CH), 8.03 (bs, 1 H, CH); **MS** (ESI, MeOH/H₂O + 10 mmol NH₄Ac): m/z (%) = [M³⁺ + CH₃COO⁻]²⁺.

Fractogel-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (**83**)



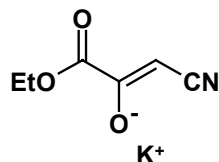
0.60 g (1.27 mmol) 1,4,7-Tris-*tert*-butyloxycarbonyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecan **74** und 4.00 g Fractogel[®] EMD Epoxy werden unter Rühren (KPG-Rührer) in 80 ml wässrigem Carbonatpuffer (pH 10) 4 d auf 40 °C erwärmt. Die Polymer-Oligoamid-Spezies wird abgesaugt und zur Deaktivierung nicht umgesetzter Epoxidgruppen 2 h bei 40 °C in 20 ml Tris/HCl-Puffer (pH 8), der 0.2 mol/l Glycin enthält, gerührt. Das Polymer wird abgesaugt, mit 20 ml TFA versetzt und 10 min bei RT gerührt. Danach wird der Feststoff filtriert und mit 50 ml 2 N NaOH sowie 100 ml H₂O gewaschen. Nach Trocknen im Hochvakuum bei 50 °C (über Nacht) wird das Produkt **83** (4.01 g) in Form eines farblosen Feststoffs isoliert.

Elementaranalyse: C 53.32, H 8.02, N 0.80.

1-Fractogel-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-zink(II)-di-perchlorat (84)

Das funktionalisierte Polymer **83** (2.02 g) und $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ (1.34 g, 3.6 mmol) werden in 10 ml Wasser suspendiert und 3 h auf 80 °C erwärmt. Anschließend wird das Produkt abfiltriert und gründlich mit H_2O und MeOH gewaschen. Nach Trocknen im Hochvakuum wird Verbindung **84** (1.90 g) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Elementaranalyse: C 51.45, H 7.60, N 0.85.

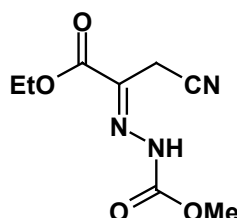
Kalium-1-ethoxycarbonyl-but-1-en-3-in-1-olat (88):

In einem Schlenckkolben werden 50.0 g (1.28 mol) Kalium in 320 ml absolutem EtOH und 225 ml absolutem Et_2O gelöst. Nach Abkühlen auf 0 °C (Eisbad) werden 93.5 g (0.64 mol) Oxalsäurediäylester in 30 ml Et_2O zugetropft und 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend werden 26.3 g (0.64 mol) CH_3CN in 30 ml Et_2O hinzugefügt. Nach Entfernen des Eisbades wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt und der ausfallende Feststoff abgesaugt. Das in Form eines gelblichen Feststoffs erhaltene Kaliumsalz des Cyanopyruvates **88** (115 g, 0.6 mol, 100%) wird ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

Schmpkt.: 105 °C (Zersetzung); **IR** (KBr): $\bar{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3393, 2170, 1626, 1558, 1363, 1310, 1112, 594, 526$; **$^1\text{H-NMR}$** (250 MHz, D_2O): $\delta [\text{ppm}] = 1.19$ (t, 3 H,

$^3J = 7.1$ Hz, CH₃), 4.13 (q, 2 H, $^3J = 7.1$ Hz, CH₂), 4.80 (s, 1H, CH); **MS** (ESI, H₂O): m/z (%) = 140 (100) [M]⁻.

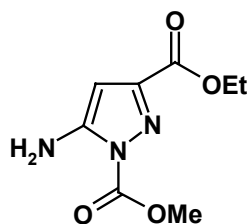
2-(Methoxycarbonyl-hydrazono)-pent-4-in-säure-ethylester (89)



895 mg (5.00 mmol) des Eduktes **88** werden in 50 ml absolutem Chloroform suspendiert und anschließend mit 3 ml chlorwasserstoffgesättigtem EE versetzt. Nach Zugabe von 450 mg (5.00 mmol) Hydrazinoameisensäuremethylester wird 24 h bei RT gerührt und vom ungelösten Feststoff abfiltriert. Das nach Einengen erhaltene ölige Rohprodukt wird über Kieselgel mit EE als Laufmittel gereinigt ($R_f = 0.72$). **89** wird in Form eines farblosen Feststoffs (1.95 mmol, 39 %) erhalten.

Schmpkt.: 131 °C; **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3250, 2250, 1700; **¹H-NMR** (250 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 1.40 (t, 3 H, $^3J = 7.1$, CH₃-Ester), 3.61 (s, 2 H, CH₂), 3.89 (s, 3 H, OCH₃), 4.38 (q, 2 H, $^3J = 7.1$, CH₂-Ester), 11.93 (bs, 1 H, NH); **MS** (CI, CH₂Cl₂, NH₃): m/z (%) = 214 (34) [MH]⁺, 231 (100) [M + NH₄]⁺; **Elementaranalyse** ber. für C₈H₁₁N₃O₄: C 45.07; H 5.20, N 19.71, gef. C 44.91; H 5.10, N 19.50.

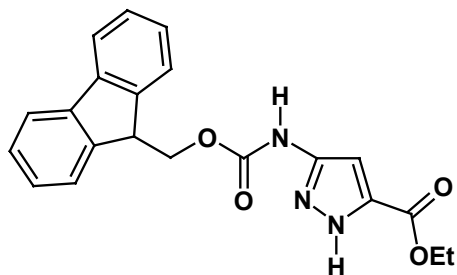
5-Amino-pyrazol-1, 3-dicarbonsäure-3-ethylester-1-methylester (90)



107 mg (0.50 mmol) des Eduktes **89** werden in 5 ml absolutem CH₃CN gelöst und mit 0.14 ml (1.00 mmol) Triethylamin versetzt. Nach 10 min Rühren bei RT wird die Lösung eingeeengt und der erhaltene Feststoff aus EE umkristallisiert. Das Produkt **90** wird in Form farbloser Kristalle (104 mg, 0.49 mmol, 98 %) isoliert (R_f = 0.52, EE).

Schmpkt.: 163 °C; **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3490, 3287, 3157, 1744, 1729, 1614, 1457, 1243; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{\max} [nm] (lg ϵ) = 216 (4.37), 292 (3.58); **¹H-NMR** (250 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 1.38 (t, 3 H, 3J = 7.1, CH₃-Ester), 4.06 (s, 3 H, OCH₃), 4.39 (q, 2 H, 3J = 7.1, CH₂), 5.50 (bs, 2 H, NH₂), 5.90 (s, 1 H, CH); **¹³C-NMR** (62 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 14.26 (+), 54.82 (+), 61.52 (-), 89.82 (+), 147.34 (C_{quart}), 151.26 (C_{quart}), 152.16 (C_{quart}), 161.92 (C_{quart}); **MS** (EI, CH₂Cl₂): m/z (%) = 213 (36) [M⁺], 169 (24) ([M⁺-C₂H₄O], 141 (100) ([M⁺-C₃H₄O₂]; **HRMS** (C₈H₁₁N₃O₄): ber. 213.0750, gef. 213.0752 \pm 0.56 ppm; **Elementaranalyse** ber. für C₈H₁₁N₃O₄: C 45.07; H 5.20, N 19.72, gef. C 44.87; H 5.04, N 19.44.

3-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-1H-pyrazol-5-carbonsäureethylester (**91**)

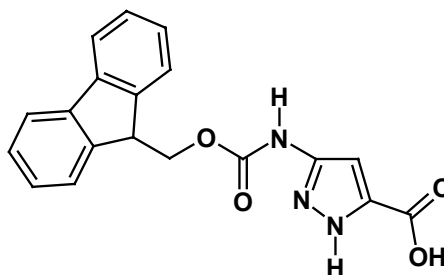


Verbindung **90** (4.00 g, 18.76 mmol) wird in 100 ml absolutem THF gelöst und nach Zugabe von 6.40 g (24.74 mmol) (9-Fluorenylmethyl)-chloroformiat 22 h bei 70 °C gerührt. Die Lösung wird eingeeengt, der zurückbleibende Feststoff in CH₂Cl₂ gelöst und auf Kieselgel aufgezogen. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel mit EE:PE = 1:2 als Laufmittel werden 6.80 g (18.01 mmol, 96 %) des Produktes **91** in Form eines farblosen Feststoffs (R_f = 0.18) isoliert.

Schmpkt.: 180 °C ; **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3366, 3247, 3124, 1706, 1636, 1586, 1523, 1297, 1254, 1221, 1061, 10283; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{\max} [nm] (lg ϵ) = 208 (4.79), 220

(sh, 4.51), 265 (4.32), 275 (sh, 4.14), 289 (3.71), 300 (3.74); **¹H-NMR** (250 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 1.30 (t, 3 H, $^3J = 7.1$ Hz, CH₃), 4.23-4.46 (m, 5 H, CH₂, CH), 7.43 (bs, 1 H, CH), 7.35-7.41 (m, 4 H, CH-aromatisch Fmoc), 7.73-7.77 (m, 2 H, CH-aromatisch Fmoc), 7.89-7.93 (m, 2 H, CH-aromatisch Fmoc), 10.39 (bs, 1 H, NH), 13.48 (bs, 1 H, NH-Pyrazol); **¹³C-NMR** (62 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 13.96 (+), 46.44 (+), 60.72 (–), 66.03 (–), 98.07 (+), 120.04 (+), 125.14 (+), 127.08 (+), 127.69 (+), 134.51 (C_{quart}), 140.69 (C_{quart}), 143.55 (C_{quart}), 146.50 (C_{quart}), 153.39 (C_{quart}), 159.25 (C_{quart}); **MS** (FAB, CH₂Cl₂/MeOH, Glycerin): m/z (%) = 378 (100) [MH]⁺; **HRMS** (C₂₁H₁₉N₃O₄): ber. 378.1454 [MH]⁺, gef. 378.1453 [MH]⁺ \pm 0.78 ppm; **Elementaranalyse** ber. für C₂₁H₁₉N₃O₄: C 66.83; H 5.07, N 11.13, gef. C 66.43; H 5.05, N 10.87.

3-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-1H-pyrazol-5-carbonsäure
(Fmoc-Pz(H)-OH, 92):

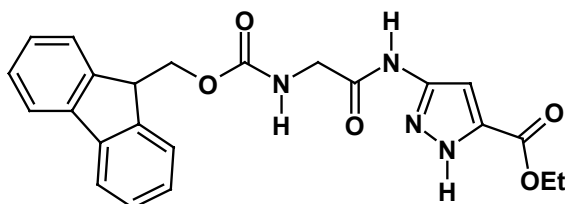


7.90 g (20.93 mmol) des Eduktes **91** werden in einer Mischung aus 100 ml halbkonzentrierter HCl, 70 ml Eisessig und 40 ml EtOH suspendiert. Nach Behandeln im Ultraschallbad wird die Reaktionsmischung 2 d bei 115 °C gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene gelbliche Feststoff wird in CH₂Cl₂ suspendiert, mehrerer Minuten im Ultraschallbad behandelt und anschließend das Lösungsmittel abpipettiert. Der Vorgang wird zweimal wiederholt, wobei der zurückbleibende Feststoff beim letzten Mal abgesaugt wird. Nach Trocknen in der Trockenpistole (40 °C) über P₄O₁₀ wird die Verbindung **92** (6.65 g, 19.05 mmol, 91 %) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten ($R_f = 0.1$, CH₂Cl₂:MeOH:NH₃ = 80:20:1).

Schmpkt.: 250 °C (Zersetzung); **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3350, 3110, 1702, 1631, 1561, 1240; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{\max} [nm] (lg ϵ) = 208 (4.82), 220 (sh, 4.43), 265 (4.35), 276

(sh, 4.16), 288 (3.77), 300 (3.78); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 4.27 (t, 1 H, $^3J = 7.1$ Hz, CH), 4.38 (d, 2 H, $^3J = 7.1$ Hz, CH₂), 7.29-7.46 (m, 4 H, CH-aromatisch Fmoc), 7.76 (d, 2 H, $^3J = 6.9$ Hz, CH-aromatisch Fmoc), 7.88 (d, 2 H, $^3J = 7.5$ Hz, CH-aromatisch Fmoc), 10.43 (bs, 1 H, NH), 11.50-14.50 (bs, 2 H, NH-Pyrazol, OH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 46.51 (+), 66.07 (-), 98.24 (+), 120.16 (+), 125.35 (+), 127.11 (+), 127.71 (+), 134.96 (C_{quart}), 140.76 (C_{quart}), 143.71 (C_{quart}), 147.08 (C_{quart}), 153.52 (C_{quart}), 160.52 (C_{quart}); **MS** (FAB, DMSO/Glycerin): m/z (%) = 348 (20) [M-H]⁻; **HRMS** (C₁₉H₁₅N₃O₄): ber. 348.0984 [M-H]⁻, gef. 348.0989 [M-H]⁻ \pm 1.85 ppm.

Fmoc-Gly-Pz(H)-OEt (93):

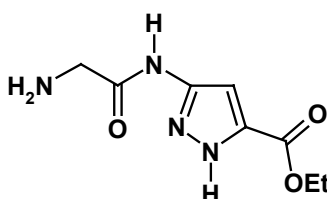


3.80 g (17.82 mmol) der Verbindung **90** werden in 120 ml absolutem THF gelöst und nach Zugabe von 6.19 g (19.61 mmol) *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-glycinchlorid 24 h bei 70 °C gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird das gelbliche Rohprodukt auf Kieselgel aufgezogen und an Kieselgel mit EE:PE = 4:1 als Laufmittel chromatographiert. Verbindung **93** (7.50 g, 17.26 mmol, 97 %) wird als farbloser Feststoff isoliert ($R_f = 0.32$, EE:PE = 2:1).

Schmpkt.: 132 °C; **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3307, 3173, 1704, 1591, 1548, 1506, 1254; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{\max} [nm] (lg ϵ) = 208 (4.73), 220 (sh, 4.47), 266 (4.27), 276 (sh, 4.12), 289 (3.73), 300 (3.74); **¹H-NMR** (250 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 1.30 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3 H, CH₃), 3.81 (d, 2 H, $^3J = 5.7$ Hz, CH₂-Glycin), 4.15-4.41 (m, 5 H, CH₂-Ester, CH₂-Fmoc, CH-Fmoc), 6.96 (bs, 1 H, CH-Pyrazol), 7.29-7.47 (m, 4H, CH-aromatisch Fmoc), 7.62 (t, 1 H, $^3J = 5.7$ Hz, NH), 7.73 (d, 2 H, $^3J = 5.9$ Hz, CH-aromatisch Fmoc), 7.90 (d, 2 H, $^3J = 7.1$ Hz, CH-aromatisch Fmoc); 10.67 (bs, 1 H, NH), 13.55 (bs, 1 H, NH-Pyrazol); **¹³C-NMR** (62 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm] = 14.10 (+), 43.44 (-), 46.60 (+), 60.78 (-), 65.72 (-), 99.20 (+), 120.10 (+),

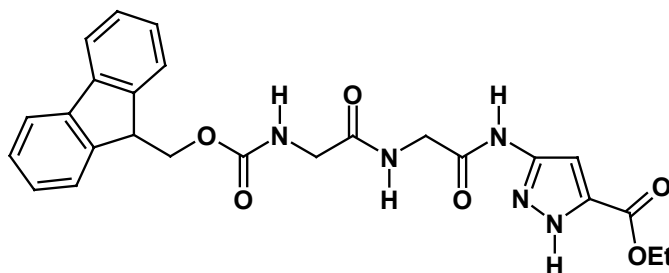
125.23 (+), 127.06 (+), 127.61 (+), 133.02 (C_{quart}), 140.71 (C_{quart}), 143.83 (C_{quart}), 147.53 (C_{quart}), 156.56 (C_{quart}), 158.83 (C_{quart}), 167.53 (C_{quart}); **MS** (FAB, CH₂Cl₂, Glycerin): m/z (%) = 435 (100) [MH]⁺; **HRMS** (C₂₃H₂₂N₄O₅): ber. 435.1668 [MH]⁺, gef. 435.1662 [MH]⁺ ± 1.40 ppm.

H-Gly-Pz(*H*)-OEt (**94**):



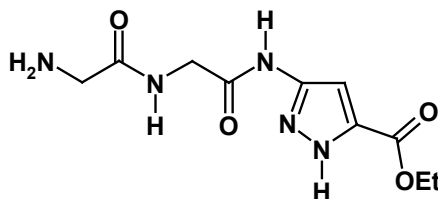
Verbindung **93** (200 mg, 0.46 mmol) wird in 2 ml 20 %igem Piperidin in DMF gelöst und 15 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und der erhaltene Feststoff auf Kieselgel aufgezogen. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel mit CH₂Cl₂:MeOH:NH₃ = 80:20:1 werden 91 mg (0.43 mmol, 93 %) des Produktes **94** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten (R_f = 0.54).

Schmpkt.: 188 °C (Zersetzung); **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3374, 3236, 1722, 1654, 1528, 1472; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{\max} [nm] (lg ϵ) = 219 nm (3.79); **¹H-NMR** (250 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 1.31 (t, 3 H, ³ J = 7.1 Hz, CH₃), 3.32 (s, 2 H, CH₂-Glycin), 4.30 (q, 2 H, ³ J = 7.1 Hz CH₂), 6.94 (s, 1 H, CH); **¹³C-NMR** (62 MHz, DMSO-d₆, TMS), δ [ppm] = 14.10 (+), 44.51 (–), 60.64 (–), 98.27 (+), 134.72 (C_{quart}), 145.89 (C_{quart}), 159.39 (C_{quart}), 170.90 (C_{quart}); **MS** (EI, 70 eV): m/z (%) = 212 (10) [M]⁺, 155 (12) [M-NHCOCH₂NH₂]⁺; **HRMS** (C₈H₁₂N₄O₃): ber. 212.0909, gef. 212.0908 ± 0.39 ppm.

Fmoc-Gly-Gly-Pz(H)-OEt (95)

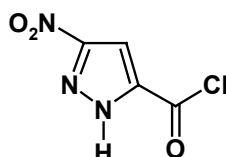
100 mg (0.23 mmol) der Verbindung **94** und 145 mg (0.46 mmol) *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-glycinchlorid werden in 4 ml absolutem DMF gelöst. Durch Zugabe von *N,N*-Diisopropylethylamin wird der pH-Wert der Lösung auf 8-9 eingestellt. Nach 30 min Rühren bei RT wird das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Der ölige Rückstand wird in CH₂Cl₂ suspendiert, einige Minuten im Ultraschallbad behandelt und das Lösungsmittel anschließend wieder entfernt. Der erhaltene Feststoff wird auf Kieselgel aufgezogen und mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH₂Cl₂:MeOH:NH₃ = 100:10:1 als Laufmittel gereinigt (*R_f* = 0.20). Es werden 46 mg (0.09 mmol, 41 %) des Produktes **95** in Form eines farblosen Feststoffs isoliert.

Schmpkt.: 198 °C (Zersetzung); **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3325, 3140, 1701, 1640, 1571, 1211; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{max} [nm] (lg ϵ) = 208 (4.73), 220 (sh, 4.49), 265 (4.28), 275 (sh, 4.12), 289 (3.69), 300 (3.70); **¹H-NMR** (250 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 1.30 (t, 3 H, ³*J* = 7.1 Hz, CH₃), 3.69 (d, 2 H, ³*J* = 6.0 Hz, CH₂-Glycin), 3.91 (d, 2 H, ³*J* = 5.6 Hz CH₂-Glycin), 4.19-4.36 (m, 5 H, 2 CH₂-Ester, CH₂-Fmoc, CH-Fmoc), 6.92 (bs, 1 H, CH-Pyrazol), 7.29-7.47 (m, 4 H, CH-aromatisch Fmoc), 7.60 (t, 1 H, ³*J* = 6.0 Hz, 1 H, NH), 7.72 (d, 2 H, ³*J* = 7.1 Hz, CH-aromatisch Fmoc), 7.89 (d, 2 H, ³*J* = 7.1 Hz, CH-aromatisch Fmoc), 8.19 (t, 1 H, ³*J* = 5.6 Hz, NH), 10.63 (s, 1 H, NH), 13.55 (bs, 1 H, NH-Pyrazol); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 14.11 (+), 42.11 (–), 43.43 (–), 46.62 (+), 60.73 (–), 65.73 (–), 99.02 (+), 120.11 (+), 125.25 (+), 127.08 (+), 127.62 (+), 133.17 (C_{quart}), 140.71 (C_{quart}), 143.84 (C_{quart}), 147.30 (C_{quart}), 156.51 (C_{quart}), 159.02 (C_{quart}), 167.22 (C_{quart}), 169.57 (C_{quart}); **MS** (FAB, DMSO/Glycerin): *m/z* (%) = 492 (100) [MH]⁺; **HRMS** (C₂₅H₂₅N₅O₆): ber. 492.1883 [MH]⁺, gef. 492.1879 [MH]⁺ ± 1.20 ppm.

H-Gly-Gly-Pz(*H*)-OEt (96)

Das Edukt **95** (360 mg, 0.73 mmol) wird in 2 ml 20 %igem Piperidin in DMF gelöst und 15 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird abgezogen und der erhaltene Feststoff in CH_2Cl_2 suspendiert. Nach Behandeln im Ultraschallbad wird die überstehende Lösung abpipettiert. Der Vorgang wird weitere zweimal wiederholt, wobei der zurückbleibende Feststoff beim letzten Mal abgesaugt wird. Das Produkt **96** wird in Form eines farblosen Feststoffs (193 mg, 0.72 mmol, 98 %) erhalten ($R_f = 0.16$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{NH}_3 = 80:20:1$).

Schmpkt.: 190 °C; **IR** (KBr): $\bar{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3363, 3249, 1723, 1663, 1547, 1473$; **UV/VIS** (CH_3CN): $\lambda_{\text{max}} [\text{nm}]$ ($\lg \epsilon$) = 223 (3.60); **$^1\text{H-NMR}$** (250 MHz, DMSO-d_6 , TMS): $\delta [\text{ppm}] = 1.30$ (t, 3 H, $^3J = 7.1$ Hz CH_3), 3.19 (s, 2 H, CH_2 -Glycin), 3.93 (s, 2 H, CH_2 -Glycin), 4.29 (q, 2 H, $^3J = 7.1$ Hz, CH_2 -Ester), 6.90 (s, 1 H, CH), 8.24 (bs, 1 H, NH), 10.67 (bs, 1 H, NH); **$^{13}\text{C-NMR}$** (62 MHz, DMSO-d_6 , TMS): $\delta [\text{ppm}] = 14.10$ (+), 41.97 (–), 44.29 (–), 60.69 (–), 98.83 (+), 134.13 (C_{quart}), 146.37 (C_{quart}), 159.20 (C_{quart}), 167.31 (C_{quart}), 172.84 (C_{quart}); **MS** (CI, NH_3): m/z (%) = 270 (58) $[\text{MH}]^+$, 156 (100) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{O}_2]^+$; **HRMS** ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_4$): ber. 270.1202 $[\text{MH}]^+$, gef. 270.1204 $[\text{MH}]^+ \pm 0.78$ ppm.

3(5)-Nitropyrazol-5(3)-carbonsäurechlorid (98)

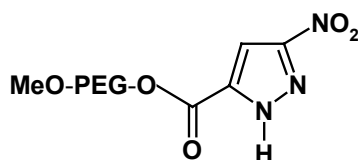
5.00 g (31.83 mmol) 3(5)-Nitropyrazol-5(3)-carbonsäure werden in 10 ml Thionylchlorid unter Zugabe von 2 Tropfen DMF innerhalb 3 h auf Rückfluss erhitzt.

Nach Abkühlen auf RT wird das überschüssige SOCl_2 im Vakuum entfernt. Das zurückbleibende Rohprodukt wird in 10 ml Benzol suspendiert, geschallt und anschließend zur Trockne einrotiert. Nach Trocknen im Hochvakuum wird **98** in Form eines gelben Feststoffs (5.25 g, 29.92 mmol, 94 %) erhalten.

Die ^1H -NMR-spektroskopische Charakterisierung der Verbindung erfolgt in Form des entsprechenden Methylesters. Dazu wird eine Probe (etwa 10 mg) in wasserfreiem Methanol gelöst, kurz gerührt und anschließend das Lösungsmittel wieder abgezogen.

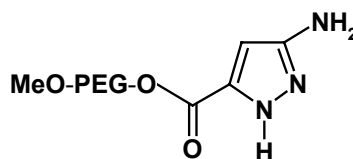
IR (KBr): $\bar{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3620, 3019, 1744, 1516, 1320, 1215$; **^1H -NMR** (250 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta [\text{ppm}] = 4.05 (\text{s}, 3 \text{ H}, \text{CH}_3), 8.47 (\text{s}, 1 \text{ H}, \text{CH-Pyrazol})$.

MeO-PEG-Pz(*H*)-NO₂ (**99**)



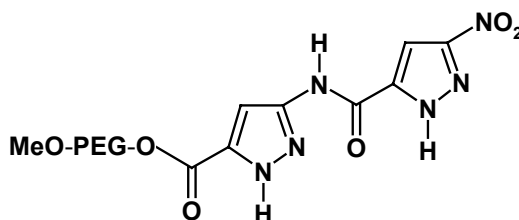
31.8 g (6.35 mmol) MeO-PEG-OH werden unter Zugabe von 9.8 ml Pyridin in 65 ml CH_2Cl_2 gelöst. Innerhalb 15 min wird zu dieser Lösung eine Lösung von 2.23 g (12.7 mmol) des Säurechlorids **98** in 65 ml DMF getropft. Die Reaktionsmischung wird 12 h bei RT gerührt und das polymergebundene Produkt anschließend durch Zugabe von Et_2O (etwa 1000 ml) ausgefällt. Der erhaltene Rückstand wird abgesaugt, kurz getrocknet und in 300 ml CH_2Cl_2 aufgenommen. Nach Erneutem Ausfällen mit Et_2O und Absaugen wird Verbindung **99** in Form eines farblosen Feststoffs isoliert. Die Belegung des Polymers ist quantitativ.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta [\text{ppm}] = 3.64 (\text{s}, 3 \text{ H}, \text{CH}_3), 7.42 (\text{s}, 1 \text{ H}, \text{CH-Pyrazol})$.

MeO-PEG-Pz(*H*)-NH₂ (100)

1.0 g (0.19 mmol) der Verbindung **99** werden in 10 ml MeOH suspendiert und durch Zugabe von 0.3 ml CH₂Cl₂ vollständig gelöst. Anschließend werden 0.5 g Ammoniumformiat und 0.1 g Palladium auf Aktivkohle (10 %ig) zugegeben. Der Beginn der Reaktion lässt sich durch die Entwicklung des bei der Zersetzung des Ammoniumformiats freiwerdenden CO₂ überprüfen. In Fällen, bei denen dies nicht zu beobachten ist, wird vorsichtig mit einer Heizpistole erwärmt. Nach dem Einsetzen der Reaktion wird 1 h bei RT gerührt und anschließend über Celite[®] filtriert. Durch Zugabe von Et₂O wird das polymergebundene Amin **100** zusammen mit überschüssigem Ammoniumformiat ausgefällt. Der erhaltene Feststoff wird in CH₂Cl₂ aufgenommen, wobei letzteres ungelöst zurückbleibt und abfiltriert werden kann. Das so erhaltene Filtrat wird erneut mit Et₂O versetzt und der ausfallende Feststoff abgesaugt. Verbindung **100** wird mit quantitativer Belegung des Polymers isoliert.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 3.64 (s, 3 H, CH₃), 6.26 (s, 1 H, CH-Pyrazol).

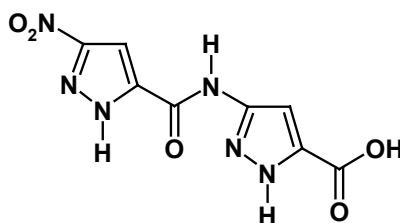
MeO-PEG-Pz(*H*)-Pz(*H*)-NO₂ (101)

0.70 g (0.14 mmol) der Verbindung **100** werden unter Zugabe von 0.5 ml Pyridin in 10 ml CH₂Cl₂ gelöst. Innerhalb von 5 min wird zu dieser Lösung eine Lösung von 0.15 g (0.85 mmol) des Säurechlorids **98** in 7 ml DMF getropft. Die Reaktionsmischung wird 12 h bei RT gerührt und das polymergebundene Produkt anschließend durch

Zugabe von Et₂O (etwa 100 ml) ausgefällt. Der erhaltene Rückstand wird abgesaugt, kurz getrocknet und in 10 ml CH₂Cl₂ aufgenommen. Nach Erneutem Ausfällen mit Et₂O und Absaugen wird Verbindung **101** in Form eines farblosen Feststoffs isoliert. Die Belegung des Polymers ist quantitativ.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 3.39 (s, 3 H, CH₃), 7.08 (s, 1 H, CH-Pyrazol), 7.97 (s, 1 H, CH-Pyrazol), 11.49 (s, 1 H, NH), 13.82 (s, 1 H, NH-Pyrazol), 14.97 (s, 1 H, NH-Pyrazol).

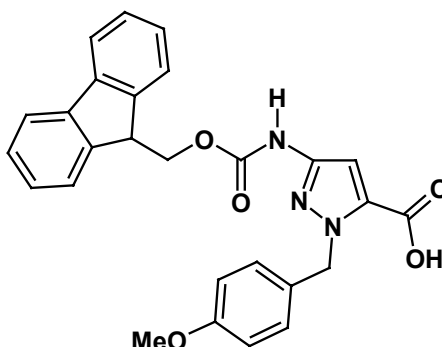
O₂N-Pz(*H*)-Pz(*H*)-OH (**102**)



700 mg (0.13 mmol) der Verbindung **101** werden in 15 ml 2 N NaOH gelöst und 5 h bei RT gerührt. Anschließend wird die wässrige Phase mit EE extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Abfiltrieren vom Trocknungsmittel wird das Lösungsmittel abgezogen und das erhaltene Rohprodukt aus EE umkristallisiert. Verbindung **102** wird in Form eines farblosen Feststoffs isoliert (30 mg, 0.11 mmol, 85 %).

Schmpkt.: 214-216 °C; **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3212, 2925, 1665, 1542, 1480, 1320, 1251, 991; **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 7.04 (s, 1 H, CH Pyrazol), 8.92 (s, 1 H, CH-Pyrazol), 11.24 (s, 1 H, NH), 13.52 (s, 1 H, NH-Pyrazol), 14.16 (s, 1 H, NH-Pyrazol; **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 99.94 (+), 102.19 (+), 134.57 (C_{quart}), 138.49 (C_{quart}), 146.21 (C_{quart}), 155.01 (C_{quart}), 155.72 (C_{quart}), 160.16 (C_{quart}); **MS** (EI, 70 eV): m/z (%) = 266 (68) [M]^{•+}; **HRMS** (C₈H₆N₆O₅): ber. 266.0399 [M]^{•+}, gef. 266.0397 [M]^{•+} ± 0.99 ppm.

***N*-4-Methoxybenzyl-3-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-amino-5-carbonsäure
(Fmoc-Pz(pMB)-OH, 107)**

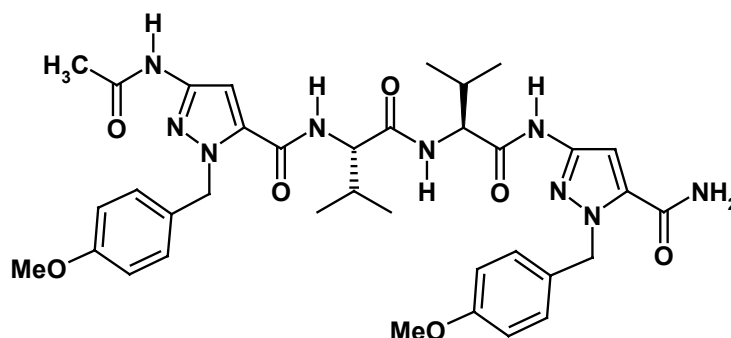


In einem Schlenckkolben werden zu einer Lösung von 910 mg (3.28 mmol) *N*-4-Methoxybenzyl-3-nitro-pyrazol-5-carbonsäuremethylester (**106**) in 4 ml absolutem DMF 65 mg Pd/C (10 %ig) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird anschließend in einen Autoklaven überführt und bei einem Wasserstoffdruck von 5 bar 4 h bei RT gerührt. Nach Filtrieren über Celite werden bei 0 °C 1.26 ml (959 mg, 7.42 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin und 891 mg (3.44 mmol) 9-(Fluorenylmethyl)-chlorfomiat zugegeben. Die Lösung wird 5 h bei RT gerührt, anschließend wird mit 4 ml H₂O verdünnt, mit 1 N HCl angesäuert (bis pH ~ 1) und mit Et₂O (3 × 5 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Einengen wird das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (Laufmittel: CH₂Cl₂:MeOH:NH₃ = 100:10:1, R_f = 0.2), wodurch **107** in Form eines farblosen bis leicht gelblichen Feststoffs (784 mg, 1.67 mmol, 51 %) isoliert wird.

Schmpkt.: 236 °C; **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3424, 3263, 3100, 2930, 1733, 1586, 1513, 1249; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{max} [nm] (lg ϵ) = 208 (4.51), 265 (4.03), 275 (sh, 3.88), 289 (3.45), 300 (3.44); **¹H-NMR** (200 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 3.71 (s, 3 H, CH₃), 4.20-4.36 (m, 3 H, CH₂-Fmoc, CH-Fmoc), 5.63 (s, 2 H, CH₂-Benzyl), 6.62 (bs, 1 H, CH-Pyrazol), 6.82-6.89 (m, 2 H, CH-aromatisch pMB), 7.14-7.22 (m, 2 H, CH-aromatisch pMB), 7.28-7.47 (m, 4 H, CH-aromatisch Fmoc), 7.78 (d, 2 H, ³*J* = 7.1 Hz, CH-aromatisch Fmoc), 7.90 (d, 2 H, ³*J* = 7.1 Hz, CH-aromatisch Fmoc), 10.19 (bs, 1 H, NH); **¹³C-NMR** (62 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 46.44 (+), 52.02 (-), 55.02 (+), 66.03 (-), 99.44 (+), 113.60 (+), 120.09 (+), 125.45 (+), 127.07 (+),

127.67 (+), 128.88 (+), 130.69 (C_{quart}), 138.69 (C_{quart}), 140.69 (C_{quart}), 143.71 (C_{quart}), 145.43 (C_{quart}), 153.40 (C_{quart}), 158.41 (C_{quart}), 162.18 (C_{quart}); **MS** (FAB, Glycerin/MeOH): m/z (%) = 470 (100) [MH]⁺; **HRMS** (C₂₇H₂₃N₃O₅): ber. 470.1716 [MH]⁺, gef. 470.1708 [MH]⁺ ± 1.32 ppm; **Elementaranalyse** ber. für C₂₇H₂₃N₃O₅: C 69.07; H 4.94, N 8.95, gef. C 68.93; H 4.88; N 8.64.

Ac-Pz(pMB)-Val-Val-Pz(pMB)-NH₂ (108)



Durchführung der Peptidsynthese analog **AAV2**

Peptidsyntheseansatz:

Fmoc-Sieber Amid-Harz: 1.00 g (0.20 mmol/g)

Erstbelegung:

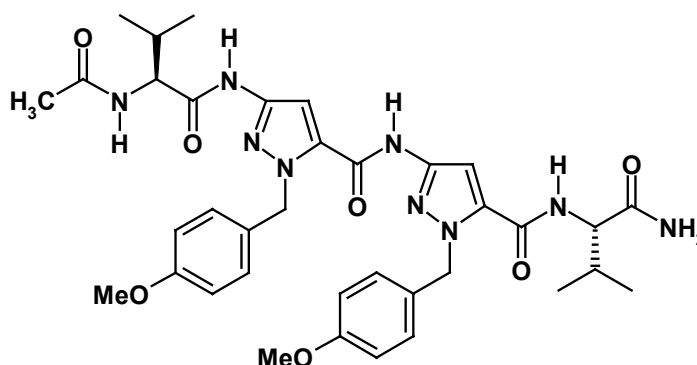
Fmoc-Pz(pMB)-Sieber Amid-Harz: 0.19 mmol/g

Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH₂Cl₂:MeOH = 10:1, R_f = 0.32) gereinigt. Es werden 124 mg (0.17 mmol, 91 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

Schmpkt.: 185°C; **Drehwert:** $[\alpha]_D^{20} = +19.4$ ($c = 0.07$ in DMSO); **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3414, 3298, 2963, 2930, 1668, 1577, 1514, 1250; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{\max} [nm] (lg ϵ) = 222 (4.72), 271 (sh, 4.13); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 0.85-0.93 (m, 12 H, CH₃-*i*-Prop), 2.00 (s, 3 H, CH₃-Acetyl), 2.02-2.20 (m, 2 H, CH-*i*-Prop), 3.69 (s, 3 H, CH₃), 3.71 (s, 3 H, CH₃), 4.28 (dd, 1 H, ³*J* = 8.7 Hz, ³*J* = 7.3 Hz, α -CH), 4.34 (dd, 1 H, ³*J* = 8.5 Hz, ³*J* = 7.3 Hz, α -CH), 5.45-5.65 (m, 4 H, CH₂-pMB), 6.79-6.89 (m, 4 H, CH-aromatisch pMB), 7.12-7.18 (m, 5 H, CH-aromatisch pMB, CH-Pyrazol), 7.26 (s, 1 H, CH-Pyrazol), 7.51 (bs, 1 H, NH von

NH₂), 7.97 (d, 1 H, ³J = 8.5 Hz, NH), 8.06 (bs, 1 H, NH), 8.63 (d, 1 H, ³J = 8.7 Hz, NH), 10.58 (s, 1 H, NH), 10.67 (s, 1 H, NH); ¹³C-NMR (62 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 18.16 (+), 19.09 (+), 19.29 (+), 23.02 (+), 29.56 (+), 30.62 (+), 52.50 (–), 52.57 (–), 55.01 (+), 55.03 (+), 57.89 (+), 59.02 (+), 98.72 (+), 99.10 (+), 113.65 (+), 113.73 (+), 128.93 (+), 129.08 (+), 129.78 (C_{quart}), 129.93 (C_{quart}), 134.66 (C_{quart}), 134.76 (C_{quart}), 145.35 (C_{quart}), 145.93 (C_{quart}), 158.58 (C_{quart}), 158.60 (C_{quart}), 159.25 (C_{quart}), 160.86 (C_{quart}), 167.54 (C_{quart}), 169.22 (C_{quart}), 170.78 (C_{quart}); **MS** (FAB, Glycerin/DMSO): m/z (%) = 716 (100) [MH]⁺; **HRMS** (C₃₆H₄₅N₉O₇): ber. 716.3520 [MH]⁺, gef. 716.3528 [MH]⁺ ± 1.23 ppm.

Ac-Val-Pz(pMB)-Pz(pMB)-Val-NH₂ (109)



Durchführung der Peptidsynthese analog **AAV2**

Peptidsyntheseansatz:

Fmoc-Sieber Amid-Harz: 1.00 g (0.20 mmol/g)

Erstbelegung:

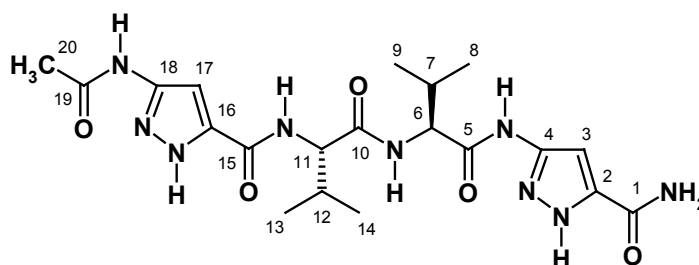
Fmoc-Val-Sieber-Amid-Polystyrol-Harz: 0.19 mmol/g

Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH₂Cl₂:MeOH = 10:1, R_f = 0.34) gereinigt. Es werden 125 mg (0.18 mmol, 92 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

Schmpkt.: 251 °C; **Drehwert:** [α]_D²⁰ = +26.7 (c = 0.06 in DMSO); **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3423, 2965, 1669, 1576, 1514, 1470, 1250; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{max} [nm] (lg ε) = 227 (4.37), 271 (sh, 4.05); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-d₆, TMS):

δ [ppm] = 0.84-0.93 (m, 12 H, CH₃-*i*-Prop), 1.88 (s, 3 H, CH₃-Acetyl), 1.95-2.02 (m, 1 H, CH-*i*-Prop), 2.05-2.12 (m, 1 H, CH-*i*-Prop), 3.70 (s, 3 H, CH₃), 3.71 (s, 3 H, CH₃), 4.21 (dd, 1 H, $^3J = 8.6$ Hz, $^3J = 7.0$ Hz, α -CH), 4.29 (dd, 1 H, $^3J = 8.6$ Hz, $^3J = 7.2$ Hz, α -CH), 5.50-5.67 (m, 4 H, CH₂-pMB), 6.83-6.89 (m, 4 H, CH-aromatisch pMB), 6.83-6.89 (m, 4 H, CH-aromatisch pMB), 7.09 (bs, 1 H, NH), 7.13-7.20 (m, 4 H, CH-aromatisch pMB), 7.41 (s, 1 H, CH-Pyrazol), 7.45 (bs, 1 H, NH), 7.45 (bs, 1 H, NH), 7.46 (s, 1 H, CH-Pyrazol), 7.96 (d, 1 H, $^3J = 8.6$ Hz, NH), 8.47 (d, 1 H, $^3J = 8.6$ Hz, NH), 10.59 (s, 1 H, NH), 11.18 (s, 1 H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (62 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 18.27 (+), 18.74 (+), 19.16 (+), 19.36 (+), 22.43 (+), 30.29 (+), 31.28 (+), 52.77 (–), 52.84 (–), 55.03 (+), 55.05 (+), 58.10 (+), 58.59 (+), 100.09 (+), 100.12 (+), 113.72 (+), 113.81 (+), 128.74 (+), 129.01 (+), 129.73 (C_{quart}), 129.76 (C_{quart}), 134.14 (C_{quart}), 134.85 (C_{quart}), 145.17 (C_{quart}), 145.55 (C_{quart}), 157.14 (C_{quart}), 158.61 (C_{quart}), 158.63 (C_{quart}), 159.10 (C_{quart}), 169.36 (C_{quart}), 169.83 (C_{quart}), 172.65 (C_{quart}); **MS** (FAB, Glycerin/DMSO): m/z (%) = 716 (100) [MH]⁺; **HRMS** (C₃₆H₄₅N₉O₇): ber. 716.3520 [MH]⁺, gef. 716.3509 [MH]⁺ \pm 1.21 ppm.

Ac-Pz(*H*)-Val-Val-Pz(*H*)-NH₂ (**110**)



Durchführung der Entschützung analog **AAV3**

Ansatz:

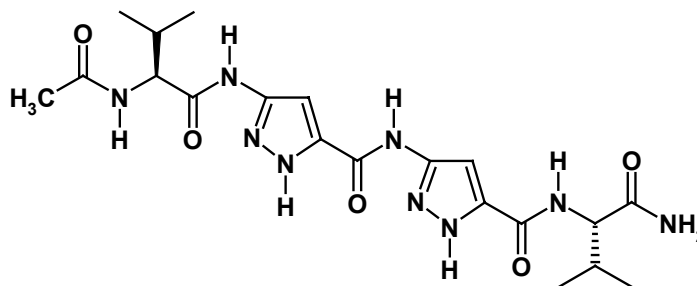
Ac-Pz(pMB)-Val-Val-Pz(pMB)-NH₂ (**108**): 100 mg (0.14 mmol)

Das Rohprodukt wird mittels semipräparativer HPLC gereinigt. Die gesammelten Fraktionen werden vereinigt und nach Entfernen des organischen Lösungsmittels am Rotationsverdampfer lyophilisiert. Zur Freisetzung der Amine des Pyrazol-Ringes wird der erhaltene Feststoff in gesättigter NaHCO₃-Lösung suspendiert, 10 min im

Ultraschallbad behandelt und anschließend filtriert. Das Oligoamid **110** wird in Form eines farblosen Feststoffs erhalten (54 mg, 0.17 mmol, 81 %).

Schmpkt.: 201 °C; **Drehwert:** $[\alpha]_D^{20} = +34.3$ ($c = 0.07$ in DMSO); **IR (KBr):** $\bar{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3264, 2967, 1665, 1594, 1526$; **UV/VIS** (CH₃CN): $\lambda_{\text{max}} [\text{nm}] (\lg \epsilon) = 222 (4.62)$; **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-d₆, TMS): $\delta [\text{ppm}] = 0.86\text{--}0.94$ (m, 12 H, 8-H, 9-H, 13-H, 14-H), 1.98–2.13 (m, 5 H, 7-H, 12-H, 20-H), 4.29–4.41 (m, 2 H, 6-H, 11-H), 7.10 (s, 1 H, 3-H), 7.28 (s, 1 H, 17-H), 7.37 (s, 1-NH_{b/a}), 7.90 (br, 2 H, 6-NH, 1-NH_{a/b}), 8.44 (d, 1 H, $J = 8.1$ Hz, 11-NH), 10.43 (s, 1 H, 18-NH), 10.49 (s, 1 H, 4-NH), 12.97 (s, 1 H, NH-Pyrazol), 13.01 (s, 1 H, NH-Pyrazol); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, TMS): $\delta [\text{ppm}] = 18.24 (+), 18.78 (+), 19.08 (+), 19.25 (+), 23.01 (+), 30.11 (+), 30.55 (+), 57.87 (+), 57.92 (+), 95.98 (+), 96.53 (+), 137.45 (\text{C}_{\text{quart}}), 146.33 (\text{C}_{\text{quart}}), 158.88 (\text{C}_{\text{quart}}), 160.45 (\text{C}_{\text{quart}}), 167.52 (\text{C}_{\text{quart}}), 169.11 (\text{C}_{\text{quart}}), 170.87 (\text{C}_{\text{quart}})$; **MS** (ESI, MeOH + 10 mmol NH₄Ac): $m/z (\%) = 474 (100) [\text{M}]^-$; **HRMS** (C₂₀H₂₉N₉O₅): ber. 476.2370 [MH]⁺, gef. 476.2362 [MH]⁺ ± 0.90 ppm.

Ac-Val-Pz(*H*)-Pz(*H*)-Val-NH₂ (**111**)



Durchführung der Entschützung analog AAV3

Ansatz:

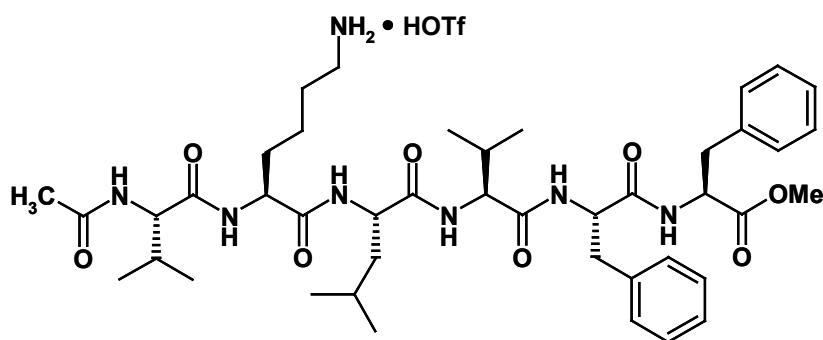
Ac-Val-Pz(pMB)-Pz(pMB)-Val-NH₂ (**109**): 100 mg (0.14 mmol)

Das Produkt wird mittels semipräparativer HPLC gereinigt. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und nach Entfernen des organischen Lösungsmittels am Rotationsverdampfer lyophilisiert. Zur Freisetzung der Amine des Pyrazol-Ringes wird der erhaltene Feststoff in gesättigter NaHCO₃-Lösung suspendiert, 10 min im

Ultraschallbad behandelt und anschließend filtriert Es werden 47 mg (0.11 mmol, 71 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

Schmpkt.: 188 °C; **Drehwert:** $[\alpha]_D^{20} = +38.8$ ($c = 0.07$ in DMSO); **IR (KBr):** $\bar{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3402, 2967, 1664, 1600, 1541$; **UV/VIS** (CH₃CN): $\lambda_{\text{max}} [\text{nm}] (\lg \epsilon) = 222 (4.56)$; **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-d₆, TMS): $\delta [\text{ppm}] = 0.87\text{--}0.94$ (m, 12 H, CH₃-*i*-Prop), 1.90 (s, 3 H, CH₃-Acetyl), 1.96-2.12 (m, 2 H, CH-*i*-Prop), 4.25-4.35 (m, 2 H, α -CH), 7.07-7.36 (br, 3 H, 2 NH, CH-Pyrazol), 7.52 (bs, 1 H, CH-Pyrazol), 8.01 (d, 1 H, $^3J = 8.5$ Hz, NH), 8.05-8.27 (bs, 1 H, NH), 10.60 (bs, 1 H, NH), 10.92 (s, 1 H, NH), 12.60-13.80 (br, 2 H, 2 NH-Pyrazol); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, TMS): $\delta [\text{ppm}] = 18.32 (+), 19.12 (+), 19.34 (+), 22.41 (+), 30.31 (+), 57.65 (+), 58.09 (+), 97.05 (+), 137.05 (\text{C}_{\text{quart}}), 145.92 (\text{C}_{\text{quart}}), 156.90 (\text{C}_{\text{quart}}), 156.29 (\text{C}_{\text{quart}}), 169.44 (\text{C}_{\text{quart}}), 169.83 (\text{C}_{\text{quart}}), 172.71 (\text{C}_{\text{quart}})$; **MS** (FAB, Glycerin/DMSO): $m/z (\%) = 476 (38) [\text{MH}]^+$; **HRMS** (C₂₀H₂₉N₉O₅): ber. 476.2370 $[\text{MH}]^+$, gef. 476.2366 $[\text{MH}]^+ \pm 1.48$ ppm.

Ac-Val-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-OMe (112)



Die Darstellung des Peptides erfolgt mittels manueller Festphasensynthese. Als polymerer Träger kommt das *Wang*-Harz mit einer mittleren Beladung von 0.9 mmol/g zum Einsatz.²⁵⁶

Die Kupplung der Fmoc-Aminosäuren wird mit DIPCDI und HOBT unter Zusatz geringer Mengen DMAP nach folgender Methode durchgeführt:

Je 2 eq geschützter Fmoc-Aminosäure, 2.5 eq Kupplungsreagenz (DIPCDI), 5.0 eq Additiv (HOBT) sowie eine Spatelspitze DMAP werden in CH₂Cl₂:DMF = 9:1 gelöst,

und bei 0 °C 60 min gerührt. Anschließend wird die Mischung zum *N*-terminal geschützten Peptidyl-Harz gegeben und es wird 120 min bei RT geschüttelt.

Bei der Anknüpfung der ersten Aminosäure an das Harz wird 60 min nachgekuppelt. Die Vollständigkeit der Kupplung wird mit dem Kaiser-Test¹⁴⁶ und dem NF 31-Test²⁴⁶ verifiziert. Bei Bedarf wird 60 min nachgekuppelt.

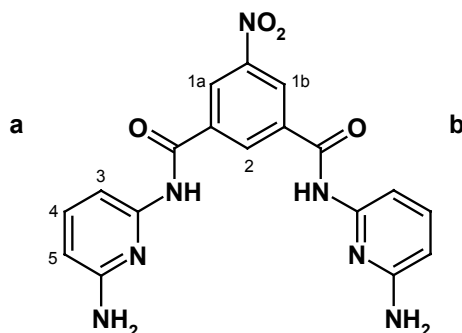
Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt mit 10 % Piperidin in DMF (2 × 30 min). Das entschützte Harz wird solange mit DMF gewaschen, bis im Filtrat kein Piperidin mehr nachweisbar ist.

Die Abspaltung des Peptides vom Harz gelingt mit TFA:CH₂Cl₂ = 1:1 (2 × 30 min). Die vereinigten Lösungen werden mit Toluol versetzt und zur Trockne einrotiert.

Zur Synthese des Methylesters wird die erhaltene freie Säure in Chlorwasserstoff-gesättigtem MeOH gelöst und 120 min bei RT gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das Rohprodukt mittels semipräparativer HPLC gereinigt.

Das *N/C*-terminal geschützte Hexapeptid wird in 72 %iger Ausbeute in Form eines farblosen Feststoffs isoliert.

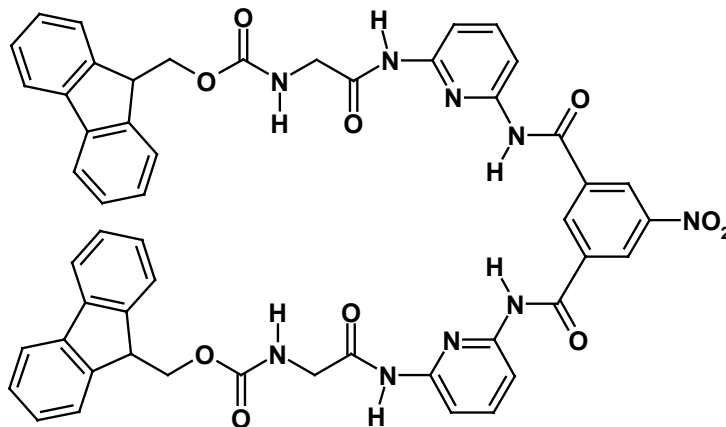
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 0.69-0.88 (m, 18 H, CH₃-Valin, CH₃-Leucin), 1.25-1.64 (m, 9 H), 1.87 (s, 3 H, CH₃-Acetyl), 1.89-1.96 (m, 2 H), 2.71-2.79 (m, 2 H), 2.92-2.98 (m, 2 H), 3.01-3.06 (m, 2 H), 3.58 (s, 3 H, CH₃-Ester), 4.08-4.16 (m, 2 H), 4.22-4.28 (m, 1 H), 4.29-4.36 (m, 1 H), 4.49 (dd, 1 H, ³*J* = 8.0 Hz, ³*J* = 7.8 Hz, α-CH), 4.54-4.60 (m, 1 H), 7.15-7.32 (m, 10 H, CH-aromatisch Phenyl), 7.60 (br, 3 H), 7.64 (d, 1 H, ³*J* = 9.1 Hz, NH), 7.89 (d, 2 H, ³*J* = 8.0 Hz, NH), 7.94 (d, 1 H, ³*J* = 8.5 Hz, NH), 8.02 (d, 1 H, ³*J* = 7.8 Hz, NH), 8.40 (d, 1 H, ³*J* = 7.3 Hz, NH); **MS** (ESI, MeOH + 10 mmol NH₄Ac): *m/z* (%) = 809 (100) [MH]⁺.

***N, N'*-Bis-(6-amino-pyridin-2-yl)-5-nitro-isophthalamid (115)**

Zu einer Suspension von 5.00 g (25.37 mmol) 5-Nitroisophthalsäure in 100 ml CH_2Cl_2 werden 38.0 ml (76.1 mmol) Oxalylchlorid und 0.20 ml (0.25 mmol) DMF gegeben. Die Reaktionsmischung wird 10 h bei RT gerührt, worauf sich eine klare gelbe Lösung bildet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels sowie des überschüssigen Oxalylchlorids wird das erhaltene Säurechlorid in 200 ml CH_2Cl_2 gelöst und unter starkem Rühren zu einer Lösung von 27.7 g (254 mmol) 2,6-Diaminopyridin und 8.84 ml (63.4 mmol) NEt_3 in 500 ml THF getropft. Die Lösung wird 3 h bei RT gerührt und anschließend zur Trockne einrotiert. Der grünlich-braune Feststoff wird in Wasser suspendiert, im Ultraschallbad behandelt, abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Zur weiteren Reinigung wird das Rohprodukt in THF gelöst und über Kieselgel (Laufmittel: EE, $R_f = 0.7$) chromatographiert. Das Isophthalamid-Derivat **115** (8.10 g, 20.6 mmol, 81 %) wird in Form eines leicht gelben Feststoffs isoliert.

Schmpkt.: 265-266 °C; **IR** (KBr): $\bar{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3482, 3337, 3088, 1652, 1626, 1535, 1462, 1305, 1246, 795$; **UV/VIS** (CH_3CN): $\lambda_{\text{max}} [\text{nm}]$ ($\lg \epsilon$) = 198 (4.89), 223 (4.82), 316 (4.39); **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, DMSO-d_6 , TMS): $\delta [\text{ppm}] = 5.83$ (s, 4 H, 2 NH_2), 6.31 (dd, 2 H, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, $^4J = 1.1 \text{ Hz}$, 5a, b-H), 7.40 (dd, 2 H, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, $^4J = 1.1 \text{ Hz}$, 3a, b-H), 7.46 (t, 2 H, $^3J = 7.7 \text{ Hz}$, 4a, b-H), 8.82 (d, 2 H, $^4J = 1.4 \text{ Hz}$, 1a, b-H), 8.94 (t, 1 H, $^4J = 1.4 \text{ Hz}$, 2a, b-H), 10.58 (s, 2 H, 2 NH); **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, DMSO-d_6 , TMS): $\delta [\text{ppm}] = 101.90$ (+), 104.39 (+), 125.38 (+), 132.62 (+), 135.82 (C_{quart}), 138.92 (+), 147.80 (C_{quart}), 149.90 (C_{quart}), 158.52 (C_{quart}), 162.85 (C_{quart}); **MS** (ESI, $\text{MeOH} + 1 \% \text{ HOAc}$): m/z (%) = 394 (100) $[\text{MH}]^+$; **HRMS** ($\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_7\text{O}_4$): ber. 393.1186 $[\text{MH}]^+$, gef. 393.1198 $[\text{MH}]^+ \pm 0.51 \text{ ppm}$.

{[6-(3-{6-[2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-acetyl-amino]-pyridin-2-ylcarbamoyl}-5-nitro-benzoylamino)-pyridin-2-ylcarbamoyl]-methyl}-carbamin-säure 9*H*-fluoren-9-ylmethylester ([Fmoc-Gly]₂-BPP-NO₂, 116)

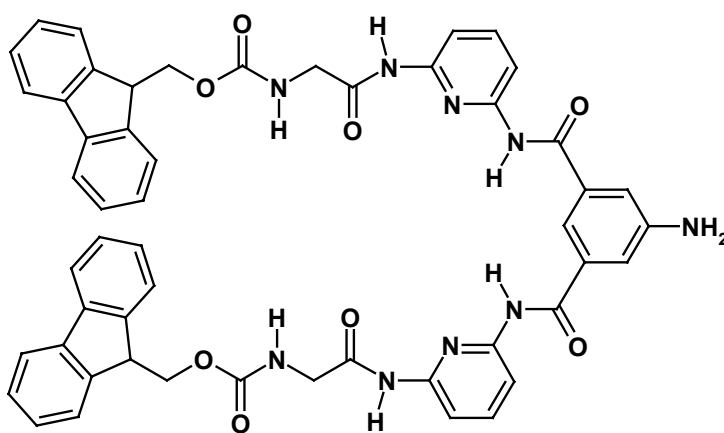


Unter Eiskühlung werden nacheinander 100 mg (0.25 mmol) *N,N'*-Bis-(6-amino-pyridin-2-yl)-5-nitro-isophthalamid **115**, 164 mg (0.55 mmol) *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-glycinchlorid, 144 mg (0.75 mmol) EDC•HCl sowie 204 mg (1.50 mmol) HOAt in 4 ml DMF gelöst. Die Reaktionsmischung wird 24 h bei RT gerührt, mit Wasser auf das doppelte Volumen verdünnt und dreimal mit je 3 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet, es wird vom Trockenmittel abfiltriert und eingeeengt. Der erhaltene gelbe Feststoff wird durch Säulenchromatographie über Kieselgel mit 5 % MeOH in CH₂Cl₂ (v/v, R_f = 0.6) als Laufmittel gereinigt. Verbindung **116** 194 mg (0.20 mmol, 80 %) wird als farbloser Feststoff isoliert.

Schmpkt.: 168 °C; **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3415, 3067, 2926, 1690, 1586, 1533, 1449, 1301, 1244, 739; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{\max} [nm] (lg ϵ) = 209 (4.84), 221 (4.73), 264 (4.56), 290 (4.47), 300 (4.50); **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 3.91 (d, 4 H, ³J = 5.8 Hz, CH₂-Glycin), 4.19-4.38 (m, 6 H, 2 CH₂-Fmoc, 2 CH-Fmoc), 7.15 (bs, 0.4 H, NH *cis*-Rotamer), 7.28-7.46 (m, 8 H, CH-aromatisch Fmoc), 7.64 (t, 2 H, ³J = 5.8 Hz, NH), 7.69-7.94 (m, 14 H, CH-aromatisch Fmoc, CH-aromatisch Pyridin), 8.92 (s, 3 H, CH-Phenyl), 10.08 (s, 2 H, 2 NH), 10.97 (bs, 2 H, 2 NH); **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 44.18 (–), 46.62 (+), 65.75 (–), 109.97 (+), 110.69 (+), 120.10 (+), 125.10 (+), 125.19 (+), 125.76 (+), 127.06 (+), 127.61 (+), 133.62 (+), 135.79 (C_{quart}), 140.36 (+), 140.71 (C_{quart}), 143.81 (C_{quart}), 147.63 (C_{quart}),

149.95 (C_{quart}), 150.22 (C_{quart}), 156.66 (C_{quart}), 163.54 (C_{quart}), 168.93 (C_{quart}); **MS** (ESI, CH₂Cl₂/MeOH + 10 mmol NH₄Ac): *m/z* (%) = 952 (20) [MH]⁺, 730 (100) [MH-Fmoc]⁺; **HRMS** (C₅₂H₄₁N₉O₁₀): ber. 952.3055 [MH]⁺, gef. 952.3041 [MH]⁺ ± 0.79 ppm.

{[6-(3-Amino-5-{6-[2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-acetylamino]-pyridin-2-ylcarbamoyl}-benzoylamino)-pyridin-2-ylcarbamoyl]-methyl}-carbamin-säure 9*H*-fluoren-9-ylmethylester ([Fmoc-Gly]₂-BPP-NH₂, 117)

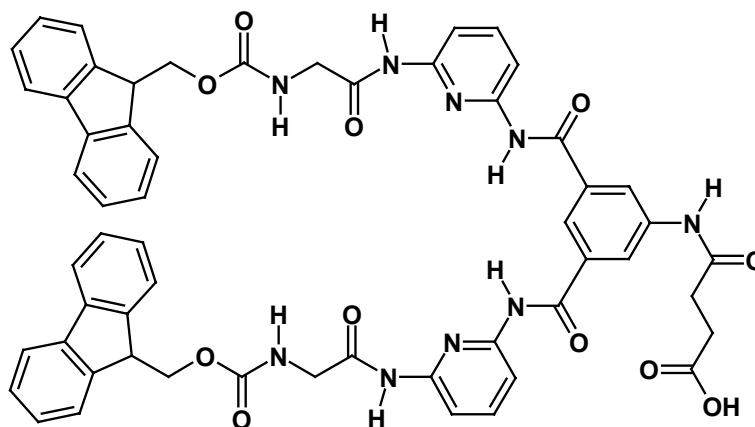


300 mg (0.32 mmol) der Verbindung **116** werden in 6 ml THF:MeOH (2:1) gelöst und nach Zugabe einer Spatelspitze Raney-Nickel 16 h in einem Autoklaven bei 10 bar Wasserstoffdruck und 70 °C gerührt. Anschließend wird die Suspension über Celite[®] filtriert und das Lösungsmittel abgezogen. Nach säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel (Laufmittel: 5 % MeOH in CH₂Cl₂ (v/v), R_f = 0.3) wird das Produkt **117** als farbloser Feststoff (283 mg, 0.31 mmol, 96 %) erhalten.

Schmpkt.: 116 °C; **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3406, 3318, 3067, 2927, 1690, 1586, 1527, 1449, 1294, 1243, 1159, 742; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{max} [nm] (lg ϵ) = 210 (4.69), 222 (4.57), 265 (4.39), 290 (4.33), 299 (4.36); **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 3.93 (s, 4 H, 2 CH₂-Glycin), 4.24 (t, 2 H, ³*J* = 6.4 Hz, CH-Fmoc), 4.34 (d, 4 H, ³*J* = 6.4 Hz, CH₂-Fmoc), 5.69 (s, 2 H, NH₂), 7.14 (bs, 0.4 H, NH *cis*-Rotamer), 7.24-7.46 (m, 10 H, CH-aromatisch Fmoc, CH-aromatisch Pyridin), 7.54-7.98 (m, 17 H, CH-aromatisch Fmoc, CH-aromatisch Pyridin, CH-aromatisch Phenyl), 10.07 (s, 2 H, NH), 10.24 (bs, 2 H, 2 NH); **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 44.22

(-), 46.66 (+), 65.77 (-), 109.53 (+), 110.45 (+), 113.97 (+), 116.43 (+), 120.11 (+), 125.21 (+), 127.08 (+), 127.64 (+), 134.96 (C_{quart}), 140.27 (+), 140.76 (C_{quart}), 143.84 (C_{quart}), 149.33 (C_{quart}), 150.16 (C_{quart}), 150.36 (C_{quart}), 156.66 (C_{quart}), 163.54 (C_{quart}), 168.93 (C_{quart}); **MS** (ESI, CH₂Cl₂/MeOH + 10 mmol NH₄Ac): m/z (%) = 922 (80) [MH]⁺, 700 (100) [MH-Fmoc]⁺; **HRMS** (C₅₂H₄₃N₉O₈): ber. 922.3313 [MH]⁺, gef. 922.3290 [MH]⁺ ± 0.67 ppm.

N-(3, 5-Bis-{6-[2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-acetylamino]pyridin-2-ylcarbamoyl}-phenyl)-succinsäure ([Fmoc-Gly]₂-BPP-Ber-OH, 118)

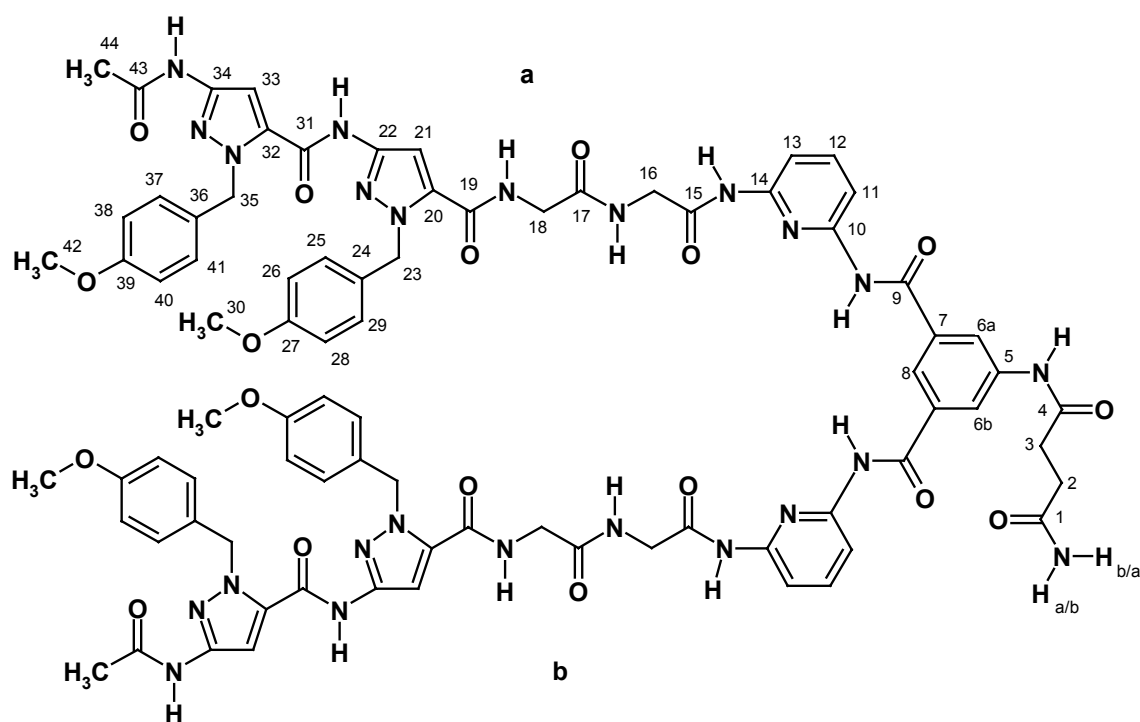


1.00 g (1.08 mmol) des Amins **117** und 450 mg (4.50 mmol) Bernsteinsäureanhydrid werden in 6 ml Dioxan gelöst und 1.5 h bei 100 °C gerührt. Aus der anfangs klaren Lösung scheidet sich ein farbloser Feststoff ab. Dieser wird nach Erkalten des Reaktionsgemisches abgesaugt und mit H₂O gewaschen. Um das überschüssige Anhydrid abzutrennen wird das erhaltene Rohprodukt in 5 ml Dioxan suspendiert, zum Rückfluss erhitzt und in heißem Zustand über eine Fritte abgesaugt. Nach dreimaligem Wiederholen dieses Vorgangs und Trocknen im Hochvakuum wird die freie Säure **118** in Form eines farblosen Pulvers (964 mg, 0.94 mmol, 87 %) isoliert.

Schmpkt.: 195-198 °C; **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3426, 3336, 3065, 2926, 1695, 1587, 1523, 1450, 1297, 1244, 1159, 739; **UV/VIS** (CH₃CN): λ_{max} [nm] (lg ϵ) = 210 (4.51), 222 (4.38), 266 (4.31), 289 (4.19), 300 (4.19); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 2.53-2.59 (m, 2 H, CH₂), 2.60-2.66 (m, 2 H, CH₂), 3.89 (d, 4 H, ³J = 5.7 Hz, CH₂-Glycin), 4.24 (t, 2 H, ³J = 6.8 Hz, CH-Fmoc), 4.33 (d, 4 H, ³J = 6.8 Hz,

CH₂-Fmoc), 7.14 (bs, 0.4 H, NH *cis*-Rotamer), 7.29-7.45 (m, 8 H, CH-aromatisch Fmoc), 7.64 (t, 2 H, ³*J* = 5.7 Hz, NH), 7.68-7.93 (m, 14 H, CH-aromatisch Fmoc, CH-aromatisch Pyridin), 8.22 (s, 1 H, CH-Phenyl), 8.36 (s, 2 H, CH-Phenyl), 10.08 (bs, 2 H, NH), 10.37 (s, 1 H, NH), 10.42 (bs, 2 H, 2 NH), 12.10 (bs, 1 H, OH); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 28.73 (–), 31.12 (–), 44.22 (–), 46.67 (+), 65.78 (–), 109.71 (+), 110.48 (+), 120.13 (+), 121.45 (+), 121.69 (+), 125.23 (+), 127.11 (+), 127.66 (+), 134.87 (C_{quart}), 139.84 (C_{quart}), 140.37 (+), 140.77 (C_{quart}), 143.86 (C_{quart}), 150.24 (C_{quart}), 156.72 (C_{quart}), 165.33 (C_{quart}), 168.96 (C_{quart}), 170.78 (C_{quart}), 173.84 (C_{quart}); **MS** (ESI, CH₂Cl₂/MeOH + 10 mmol NH₄Ac): *m/z* (%) = 1022 (100) [MH]⁺; **HRMS** (C₅₂H₄₃N₉O₈): ber. 1020.3317 [M-H][–], gef. 1020.3301 [MH]⁺ ± 1.20 ppm.

[Ac-Pz(pMB)-Pz(pMB)-Gly-Gly]₂-BPP-Ber-NH₂ (119)



Durchführung der Peptidsynthese analog **AAV2**

Peptidsyntheseansatz:

Fmoc-Sieber Amid-Harz: 815 mg (0.20 mmol/g Harz)

Erstbelegung:

[Fmoc-Gly]₂-BPP-Ber-Sieber Amid-Harz: 0.18 mmol/g Harz

Das erhaltene Rohprodukt wird in CH_2Cl_2 suspendiert, im Ultraschallbad behandelt und anschließend wieder abfiltriert. Dieses Vorgehen wird insgesamt viermal wiederholt. Verbindung **119** wird in Form eines beigen Pulvers (214 mg, 0.13 mmol, 88 %) isoliert.

Schmpkt.: >200 °C (Zersetzung) °C; **IR** (KBr): $\bar{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3398, 3081, 2923, 1658, 1578, 1514, 1449, 1299, 1246, 1177, 760$; **$^1\text{H-NMR}$** (600 MHz, DMSO-d_6 , TMS): $\delta [\text{ppm}] = 2.00$ (s, 6 H, HSQC: 44a, b-H), 2.43 (t, 2 H, $^3J = 7.0$ Hz, HSQC/ROESY: 2-H), 2.59 (t, 2 H, $^3J = 7.0$ Hz, HSQC/ROESY: 3-H), 3.67-3.69 (m, 12 H, HSQC: 30a, b-H; 42a, b-H), 3.91 (d, 4 H, $^3J = 5.8$ Hz, HSQC/COSY/ROESY: 18a, b-H), 4.02 (d, 4 H, $^3J = 5.8$ Hz, HSQC/COSY/ROESY: 16a, b-H), 5.58 (bs, 8 H, HSQC: 23a, b-H; 35a, b-H), 6.78 (bs, 1 H, ROESY: 1-NH_{a/b}), 6.81-6.86 (2 d, 8 H, $^3J = 8.8$ Hz, $^3J = 8.8$ Hz, HSQC: 26a, b-H; 28a, b-H; 38a, b-H; 40a, b-H), 7.11-7.19 (2 d, 8 H, $^3J = 8.8$ Hz, $^3J = 8.5$ Hz, HSQC: 25a, b-H; 29a, b-H; 37a, b-H; 41a, b-H), 7.36 (bs, 1 H, ROESY: 1-NH_{b/a}), 7.38 (s, 2 H, HSQC/ROESY: 21a, b-H), 7.47 (s, 2 H, HSQC/ROESY: 33a, b-H), 7.76-7.88 (m, 6 H, HSQC: 11a, b-H, 12a, b-H, 13a, b-H), 8.20 (s, 1 H, HSQC: 8-H), 8.32-8.37 (m, 4 H, HSQC/COSY/ROESY: 6a, b-H, 16a, b-NH), 9.00 (t, 2 H, $^3J = 5.8$ Hz, COSY/ROESY: 18a, b-NH), 10.11 (s, 2 H, ROESY: 14a, b-NH), 10.34 (s, 1 H, ROESY: 4-NH), 10.42 (s, 2 H, ROESY: 9a, b-NH), 10.53 (s, 2 H, ROESY: 34-NH), 11.20 (s, 2 H, ROESY: 22a, b-NH); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, DMSO-d_6 , TMS): $\delta [\text{ppm}] = 22.92$ (44a, b-C), 29.63 (2-C), 31.35 (3-C), 42.04 (18a, b-C), 42.83 (16a, b-C), 54.89, 54.93 (30a, b-C; 42a, b-C), 99.72 (21a, b-C), 99.89 (33a, b-C), 109.70, 111.41 (11a, b-C; 13a, b-C), 113.58, 113.67 (26a, b-C; 28a, b-C; 38a, b-C, 40a, b-C), 121.15 (8-C), 121.53 (6a, b-C), 128.61, 128.93 (25a, b-C; 29a, b-C; 37a, b-C, 41a, b-C), 140.16 (12a, b-C), 129.72, 134.64, 133.88, 139.71, 145.18, 145.94, 150.06, 157.09, 157.96, 158.34, 158.49, 159.38, 165.14, 167.37, 168.41, 169.11, 171.04, 173.11 (Carbonyl, C_{quart}); **MS** (ESI, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} + 1\%$ HOAc): m/z (%) = 1692 (100) $[\text{MH}]^+$, 846 (27) $[\text{MH}]^{2+}$.

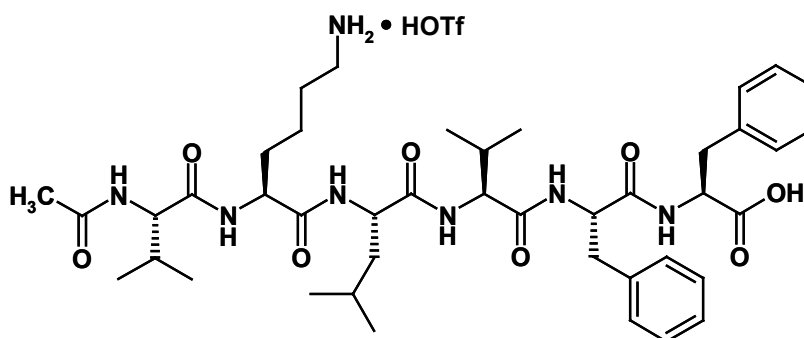
Ansatz:

Der erhaltene Feststoff wird in CH_2Cl_2 suspendiert, im Ultraschallbad behandelt und anschließend wieder abfiltriert. Dieses Vorgehen wird insgesamt viermal wiederholt. Es werden 87 mg (0.05 mmol, 87 %) eines beigen bis leicht gelben Pulvers isoliert.

Schmpkt.: >190 °C (Zersetzung) °C; **IR** (KBr): $\bar{\nu}$ [cm⁻¹] = 3394, 2925, 1654, 1572, 1514, 1451, 1298, 1246, 1172, 753; **¹H-NMR** (600 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 2.03 (s, 6 H, HSQC: 21a, b-H), 2.43 (t, 2 H, J = 7.1 Hz, HSQC/ROESY: 2-H), 2.59 (t, 2 H, J = 7.1 Hz, HSQC/ROESY: 3-H), 3.94 (d, 4 H, 3J = 5.8 Hz, HSQC/COSY/ ROESY: 18a, b-H), 4.02 (d, 4 H, 3J = 5.8 Hz, HSQC/COSY/ROESY: 16a, b-H), 6.78 (bs, 1 H, ROESY: 1-NH_{a/b}), 7.08 (bs, 2 H, HSQC/ROESY: 21a, b-H), 7.26 (bs, 2 H, HSQC/ROESY: 25a, b-H), 7.36 (bs, 1 H, ROESY: 1-NH_{b/a}), 7.76-7.89 (m, 6 H, HSQC: 11a, b-H, 12a, b-H, 13a, b-H), 8.21 (s, 1 H, HSQC: 8-H), 8.32 (t, 2 H, J = 5.8 Hz, COSY/ROESY: 16a, b-NH), 8.36 (s, 2 H, HSQC/COSY/ROESY: 6a, b-H), 8.73 (br, 2 H, COSY/ROESY: 18a, b-H), 10.15 (s, 2 H, ROESY: 14a, b-NH), 10.35 (s,

1 H, ROESY: 4-NH), 10.46 (s, 2 H, ROESY: 9a, b-NH), 10.53 (s, 2 H, ROESY: 26a, b-NH), 10.91 (s, 2 H, ROESY: 22a, b-NH), 13.00-13.80 (br, 4 H, 20a, b-NH, 24a, b-NH); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , TMS): δ [ppm] = 21.65 (27a, b-C), 28.36 (2-C), 31.35 (3-C), 40.52 (18a, b-C), 41.57 (16a, b-C), 95.30 (21a, b-C; 24a, b-C), 108.38, 109.07 (11a, b-C; 13a, b-C), 119.98 (8-C), 120.26 (6a, b-C), 138.92 (12a, b-C), 148.75, 148.80, 155.67, 156.66, 157.03, 158.39, 163.94, 166.22, 167.12, 168.04, 169.80, 171.88, 175.39 (Carbonyl, C_{quart}) ; **MS** (ESI, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ + 10 mmol NH_4Ac): m/z (%) = 1210 (37) $[\text{M}-\text{H}]^+$, 606 (100) $[\text{MH}]^{2+}$.

Ac-Val-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-OH (121)



Die Synthese erfolgt in Analogie zur Darstellung der Verbindung **112**. Nach Abspaltung des Peptids vom Harz werden die vereinigten Lösungen mit Toluol versetzt, zur Trockne einrotiert und der erhaltene Feststoff mittels semipräparativer HPLC gereinigt. Das Hexapeptid **121** wird in 74 %iger Ausbeute in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

(500 MHz, DMSO- d_6 , TMS): δ [ppm] = 0.67-0.87 (m, 18 H, CH_3 -Valin, CH_3 -Leucin), 1.21-1.63 (m, 9 H), 1.86 (s, 3 H, CH_3 -Acetyl), 1.87-1.94 (m, 2 H), 2.73-2.80 (m, 2 H), 2.93-2.99 (m, 2 H), 3.01-3.05 (m, 2 H), 3.59 (s, 3 H, CH_3 -Ester), 4.09-4.18 (m, 2 H), 4.21-4.31 (m, 2 H), 4.45-4.50 (m, 1 H), 4.55-4.60 (m, 1 H), 7.13-7.31 (m, 10 H, CH-aromatisch Phenyl), 7.62 (br, 3 H), 7.64 (d, 1 H, $^3J = 9.0$ Hz, NH), 7.88 (d, 1 H, $^3J = 8.0$ Hz, NH), 7.90 (d, 1 H, $^3J = 8.0$ Hz, NH), 7.96 (d, 1 H, $^3J = 8.4$ Hz, NH), 8.04 (d, 1 H, $^3J = 7.8$ Hz, NH), 8.40 (d, 1 H, $^3J = 7.3$ Hz, NH); **MS** (ESI, MeOH + 10 mmol NH_4Ac): m/z (%) = 795 (100) $[\text{MH}]^+$.

E Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AcOH	Essigsäure
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
A	Adenin
β	β-Alanin
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
ber.	berechnet
c	Konzentration
CD	Circulardichroismus
C	Cytosin
Cys	Cystein
d	Tage
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIEA	(<i>N,N</i>)-Diisopropylethylamin
DIPCDI	Diisopropylcarbodiimid
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dDNS	doppelsträngige Desoxyribonucleinsäure
EDC•HCl	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethyl-carbodiimid Hydrochlorid
EI	Ionenstossionisation
EE	Essigsäureethylester
eq	Äquivalent(e)
ESI	Elektrosprayionisation
EtOH	Ethanol
FAB	Fast-Atom Bombardement

Fmoc	Fluorenyl-9-methoxycarbonyl
Gly	Glycin
gef.	gefunden
G	Guanin
h	Stunde(n)
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexfluoro- phosphat
Hp	3-Hydroxy- <i>N</i> -methylpyrrol
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Ile	Isoleucin
Im	<i>N</i> -Methylimidazol
IR	Infrarot-Spektroskopie/-Spektrum
J	Kopplungskonstante
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	Molekülion
min	Minuten
MS	Massen-Spektrometrie/-Spektrum
MeOH	Methanol
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NOE	Kern-Overhauser-Effekt
Phe	Phenylalanin
Py	<i>N</i> -Methylpyrrol
PE	Petrolether 40/60
Pz(<i>H</i>)	Pyrazol mit feiem Ring-Stickstoff
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur

Schmp.	Schmelzpunkt
sh	Schulter in optischen Spektren
Tab.	Tabelle
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> , -tetramethyluroniumhexfluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T	Thymin
UV	Ultraviolett-Spektroskopie/-Spektrum
Val	Valin
Vis	sichtbarer Spektralbereich
X-Ray	Röntgenstrukturanalyse

F Literaturverzeichnis

- [1] Stryer, L.; *Biochemie*; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 4. Aufl., 1996.
- [2] Voet, D.; Voet, J. G.; *Biochemie*; ed. Maelicke, A.; Müller-Esterl, W.; VCH, Weinheim, 1.korrigierte Aufl., 1994.
- [3] Koolman, J.; Röhm, K.-H.; *Taschenatlas der Biochemie*; Georg-Thieme Verlag, Stuttgart, 1998.
- [4] Mit der abgekürzten Schreibweise dDNS sei im Folgenden immer Doppelstrang Desoxyribonucleinsäure gemeint.
- [5] Johnson, D. S. and Boger, D. L.; in *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, ed. Atwood, J. L.; Davies, J. E.; McNicol, D. D.; Vögtle, F.; Lehn, J.-M.; Elsevier Science, Oxford, 1999, Vol. 4, p. 73.
- [6] Lown, J. W.; *J. Mol. Recognit.* **1994**, 7, 79-88.
- [7] Sondhi, S. M.; Reddy, B. S.; Lown, J. W.; *Curr. Med. Chem.* **1997**, 4, 313-358.
- [8] Lerman, L. S.; *J. Mol. Biol.* **1961**, 3, 18-30.
- [9] Zimmer, C.; Wahnert, U.; *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1986**, 47, 31-112.
- [10] Bailly, C.; Chaires, J. B.; *Bioconjugate Chemistry* **1998**, 9, 513-538.
- [11] Finlay, A. C.; Hochstein, F. A.; Sobin, B. A.; Murphy, F. X.; *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 341-343.
- [12] Arcamone, F.; Penco, S.; Orezzi, P.; Nicoletta, V.; Pirelli, A.; *Nature* **1964**, 203, 1064-1065.
- [13] Zimmer, C.; Puschendorf, B.; Grunkicke, H.; Chandra, P.; Venner, H.; *Eur. J. Biochem.* **1971**, 21, 269-278.
- [14] Hahn, F. E.; in *Antibiotics*; Corcoran, J. W. und Hahn, F. E., Hrsg.; Springer-Verlag, New York, **1975**, 79.
- [15] Wartell, R. M.; Larson, J. E.; Wells, R. D.; *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, 6719-6731.
- [16] Patel, D. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, 79, 6424-6428.
- [17] Kopka, M. L.; Yoon, C.; Goodsell, D.; Pjura, P.; Dickerson, R. E.; *Mol. Biol.* **1985**, 183, 553-563.
- [18] Kopka, M. L.; Yoon, C.; Goodsell, D.; Pjura, P.; Dickerson, R. E.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 1376-1380.

- [19] Coll, M.; Fredrick, C. A.; Wang, A. H.-J.; Rich, A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 8385-8389.
- [20] Klevit, R. E.; Wemmer, D. E.; Reid, B. R.; *Biochemistry* **1986**, *25*, 3296-3303.
- [21] Pelton, J. G.; Wemer, D. E.; *Biochemistry* **1988**, *27*, 8088-8096.
- [22] Pelton, J. G.; Wemmer, D. E.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 5723-5727.
- [23] Pelton, J. G.; Wemmer, D. E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1393-1399.
- [24] Eine Auswahl neuerer Reviews aus diesem Gebiet sei gegeben:
 - a) Wemmer, D. E.; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 439-461;
 - b) Reddy, B. S. P.; Sharma, S. K.; Lown, J. W., *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 475-508;
 - c) Dervan, P. B.; *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2215-2235;
 - d) Wemmer, D. E.; *Biopolymers* **2001**, *52*, 197-211.
- [25] Wade, W. S.; Mrksich, M.; Dervan P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8783-8794.
- [26] Mrksich, M.; Wade, W. S.; Dwyer, T. J.; Geierstanger, B. H.; Wemmer, D. E.; Dervan, P. B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 7586-7590.
- [27] Wade, W. S.; Mrksich, M.; Dervan P. B.; *Biochemistry* **1993**, *32*, 11385-11389.
- [28] Mrksich, M.; Dervan P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2572-2576.
- [29] White, S.; Baird, E. E.; Dervan, P. B.; *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 569-578.
- [30] Chen, X.; Ramakrishnan, S.T.; Rao, S. T.; Sundaralingam, M.; *Nat. Struct. Biol* **1994**, *1*, 169-175.
- [31] White, S.; Baird, E. E.; Dervan P. B.; *Biochemistry* **1996**, *35*, 12532-12537.
- [32] Der Baustein 3-Hydroxy-*N*-methylpyrrol (Hp) wurde in sogenannten Hairpins verwendet. Dieser Strukturtyp wird im Verlauf dieser Einleitung noch ausführlich diskutiert.
- [33] White, S.; Szewczyk, J. W., Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan P. B.; *Nature* **1998**, *391*, 468-471.
- [34] Kielkopf, C. L.; White, S.; Szewczyk, J. W., Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan P. B.; *Science* **1998**, *282*, 111-114.
- [35] Urbach, A; Szewczyk, J. W., White, S.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11621-11629.
- [36] Gottesfeld, J. W.; Neely, L.; Trauger, J. W.; Baird, E. E.; Dervan, P. B.; *Nature* **1997**, *387*, 202-205.

-
- [37] Dickinson, L. A.; Gulizia, R. J.; Trauger, J. W.; Baird, E. E.; Mosier, D. E.; Gottesfeld, J. M.; Dervan, P. B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12890-12895.
- [38] Gottesfeld, J. M.; Turner, J. M.; Dervan, P. B.; *Gene Expression* **2000**, *9*, 77-91.
- [39] Mapp, A. K.; Ansari, A. Z.; Ptashne, M.; Dervan, P. B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 3930-3935.
- [40] Bremer, R. E.; Wurtz, N. R.; Szewczyk, J. W.; Dervan, P. B.; *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2093-2103.
- [41] Ansari, A. Z.; Mapp, A. K.; Nguyen, D. H.; Dervan, P. B.; Ptashne, M.; *Chem. Biol* **2001**, *8*, 583-592.
- [42] Gottesfeld, J. M.; Melander, C.; Suto, R. K.; Raviol, H.; Luger, K.; Dervan, P. B.; *J. Mol. Biol.* **2001**, *309*, 615-629.
- [43] Wurtz, N. R.; Pomerantz, J. L.; Baltimore, D.; Dervan, P. B.; *Biochemistry* **2002**, *41*, 7604-7609.
- [44] Wang, W.; Lown, J. W.; *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2890-2897.
- [45] Boger, D. L.; Dechantsreiter, M. A.; Ishii, T.; Fink, B. E.; Hedrick, M. P.; *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2049-2057.
- [46] Boger, D. L.; Fink, B. E.; Hedrick, M. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6382-6394.
- [47] Die Bindungskonstanten werden mittels des Ethidiumbromid-Verdrängungs-Essays bestimmt:
Morgan, A. R.; Lee, J. S.; Pulleyblank, D. E.; Murray, N. L.; Evans, D. H.; *Nucleic Acids Res.* **1979**, *7*, 547-569.
Die Methode liefert relative, keine absoluten, Werte.
- [48] Eine weitere Literaturstelle zu Thiophencarboxamiden sei gegeben:
Arcamone, F. M.; Animati, F.; Barbieri, B.; Configliacchi, E.; D'Alessio, R.; Gerono, C.; Giuliani, F. C.; Lazzari, E.; Menozzi, M.; Monelli, N.; Penco, S.; Verini, M. A.; *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 774-778.
- [49] Rao, K. E.; Bathini, Y.; Lown, J. W.; *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 728-737.
- [50] Rao, K. E.; Shea, R. G.; Yadagiri, B.; Lown, J. W.; *Anti-Cancer Drug Des.* **1990**, *5*, 3-20.
- [51] Kumar, S.; Jaseja, M.; Zimmermann, J.; Yadagiri, B.; Lown, J. W.; *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1990**, *8*, 99-121.

- [52] Kumar, S.; Bathini, Y.; Joseph, T.; Pon, R. T.; Lown, J. W.; *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1991**, *9*, 1-21.
- [53] Plouvier, B.; Bailly, C.; Houssin, R.; Rao, K. E.; Lown, J. W.; Hénichart, J.-P.; Waring, M. J.; *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 5821-5829.
- [54] Literatur zu weiteren Thiazol-Oligocarboxamiden sei gegeben:
- a) Plouvier, B.; Bailly, C.; Houssin, C.; Rao, K. E.; Lown, J. W.; Hénichart, J.-P.; *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 5821-5829;
- b) Lown, J. W.; *Antiviral Res.* **1992**, *17*, 179-196;
- c) Sakai, Y.; Matsumoto, T.; Tanaka, A.; Shibuya, M.; *Heterocycles* **1993**, *36*, 565-573;
- d) Plouvier, B.; Houssin, R.; Helbecque, N.; Colson, P.; Houssier, C.; Hénichart, J.-P.; Bailly, C.; *Anti-Cancer Drug Des.* **1995**, *10*, 155-166;
- e) Baraldi, P. G.; Beria, I.; Cacciari, B.; Capolongo, L.; Cozzi, P.; Mongelli, N.; Romagnoli, R.; Spalluto, G.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1247-1252.
- f) Ryabinin, V. A.; Sinyakov, A. N.; *Bioorg. Chim.* **1998**, *24*, 601-607;
- g) Ryabinin, V. A.; Zakharova, O. D.; Yurchenko, E. Y.; Timofeeva, O. A.; Martyanov, I. V.; Tokarev, A. A.; Belanov, E. F.; Bormotov, N. I.; Tarrago-Litvak, L.; Andreola, M. L.; Litvak, S.; Nevinsky, G. A.; Sinyakov, A. N.; *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 985-993;
- h) Sharma, S. K.; Tandon, M.; Lown, J. W.; *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1102-1107;
- i) Khalaf, A. I.; Pitt, A. R.; Scobie, M.; Suckling, C. J.; Urwin, J.; Waigh, R. D.; Fishleigh, R. V.; Young, S. C.; Wylie, W. A.; *Tetrahedron* **2000**, *56*, 5225-5239;
- j) Bugreev, D. V.; Vasutina, E. L.; Ryabinin, V. A.; Sinyakov, A. N.; Buneva, V. N.; Nevinsky, G. A.; *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2001**, *11*, 137-147;
- k) Burckhardt, G.; Simon, H.; Birch-Hirschfeld, E.; Kittler, L.; Sharma, S. K.; Lown, J. W.; Zimmer, C.; *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2002**, *19*, 1101-1109;
- l) Sharma, S. K.; Tandon, M.; Lown, J. W.; *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3417-3421.
- [55] Umezawa, H.; Maeda, K.; Takeuchi, T.; Okami, Y.; *J. Antibiot. A* **1966**, *19*, 200-209.
- [56] Bailly, C.; Colson, P.; Houssier, C.; Houssin, R.; Mrani, D.; Gosselin, G.; Imbach, J.-L.; Waring, M. J.; Lown, J. W.; Hénichart, J.-P.; Bailly, C.; *Biochemistry* **1992**, *31*, 8349-8362.
- [57] Weitere Literaturstellen zu Bis-Thiazolcarboxamiden seien gegeben:

- a) Mrani, D.; Gosselin, G.; Bailly, C.; Houssin, R.; Rao, K. E.; Zimmermann, J.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Hénichart, J.-P.; Imbach, J.-L.; Lown, J. W.; *J. Med. Chem.* **1992**, 27, 331-341;
- b) Plouvier, B.; Houssin, R.; Hecquet, B.; Colson, P.; Houssler, C.; Waring, M. J.; Hénichart, J.-P.; Bailly, C.; *Bioconjugate Chemistry* **1994**, 5, 475-481.
- [58] Lee, M.; Krowicki, K.; Shea, R. G.; Lown, J. W.; Pon, R. T.; *J. Mol. Recognit.* **1989**, 2, 854-861.
- [59] Weitere Literaturstellen zu Furancarboxamiden seien gegeben:
- a) Mikheikin, A. L.; Nikitin, A. M.; Strel'tsov, S. A.; Leinsoo, T. A.; Chekhov, V. O.; Brusov, R. V.; Zhudse, A. L.; Gurskii, G. V.; Shafer, R.; Zasedatelev, A. S.; *Mol. Biol.* **1997**, 31, 854-861;
- b) Zheng-Yun, J. Z.; Dervan, P. B.; *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 2467-2474.
- [60] Arcamone, M. A.; Animati, F.; Barbieri, B.; Configliacchi, E.; D'Alessio, R.; Geroni, C.; Giuliani, F. C.; Lazzari, E.; Menozzi, M.; Monelli, N.; Penco, S.; Verini, M. A.; *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 774-778.
- [61] Pezzoni, G.; Grandi, M.; Basoli, G.; Capolongo, L.; Ballinari, D.; Giuliani, F. C.; Barbieri, B.; Pastori, A.; Pesenti, E.; Monelli, N.; *Br. J. Cancer* **1991**, 64, 1047-1050.
- [62] Weitere Literaturstellen zu Pyrazolcarboxamiden seien gegeben:
- a) Ding, L.; Grehn, L.; DeClerq, E.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Balzarini, J.; Fransson, B.; Ragnarsson, U.; *Acta Chem. Scand.* **1994**, 48, 498-505;
- b) 54e);
- c) Baraldi, P. G.; Beria, I.; Cacciari, B.; Capolongo, L.; Cozzi, P.; Franzetti, N.; Mognelli, R.; Romagnoli, R.; Spalluto, G.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 1241-1246;
- d) Baraldi, P. G.; Cacciari, B.; Guiotto, A.; Romagnoli, R.; Spalluto, G.; Zaid, A. N.; Capolongo, L.; Cozzi, P.; Geroni, C.; Mongelli, N.; *Il Farmaco* **1997**, 52, 717-723;
- f) Wyatt, M. D.; Lee, M.; Hartely, J. A.; *Anti-Cancer Drug Des.* **1997**, 12, 49-60;
- g) Marchini, S.; Cozzi, P.; Beria, I.; Geroni, C.; Capolongo, L.; D'Incalci, M.; Broggin, M.; *Anti-Cancer Drug Des.* **1998**, 13, 193-205;
- h) Baraldi, P. G.; Cozzi, P.; Geroni, C.; Monelli, N.; Romagnoli, R.; Spalluto, G.; *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 251-262;

- i) Cozzi, P.; *Il Farmaco* **2001**, 56, 57-65;
- j) Baraldi, P. G.; Balboni, G.; Pavani, M. G.; Spalluto, G.; Tabrizi, M. A.; DeClerq, E.; Balzarini, J.; Bando, T.; Sugiyama, H.; Romagnoli, R.; *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2536-2543.
- k) Nguyen, D. H.; Szewczyk, J. W.; Baird, E. E.; Dervan, P. B.; *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 7-17.
- [63] Rao, K. E.; Krowicki, K.; Burckhart, G.; Zimmer, C.; Lown, J. W.; *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, 4, 241-252.
- [64] Dervan, P. B.; *Science* **1986**, 232, 464-471.
- [65] Dervan, P. B.; in *Nucleic Acids and Molecular Biology Vol. 2*; Springer-Verlag, Heidelberg, **1988**, 49.
- [66] Youngquist, R. S.; Dervan, P. B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 2565-2569.
- [67] Kelly, J. J.; Baird, E. E.; Dervan, P. B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 6981-6985.
- [68] Kielkopf, C. L.; Baird, E. E.; Dervan, P. B.; Rees, D. C.; *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 104-109.
- [69] Goodsell, D.; Dickerson, R. E.; *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 727-733.
- [70] Lown, J. W.; Krowicki, K.; Balzarini, J.; Newman, R. A.; De Clerck, E.; *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 2368-2375.
- [71] Beerman, T. A.; Woynarowski, J. M.; Sigmund, R. D.; Gawron, L. S.; Rao, K. E.; Lown, J. W.; *Biochem. Biophys. Acta* **1991**, 1090, 52-60.
- [72] Wang, W.; Lown, J. W.; *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 2890-2897.
- [73] Weitere Literaturstellen zu Lexitropsinen, die über poly-Methylen Linker Kopf-Kopf verbrückt sind, seien gegeben:
 - a) Khorlin, A. A.; Krylov, A. S.; Grokhovsky, S. L.; Zhuze, A. L.; Zasedatelev, A. S.; Gursky, G. V.; Gottikh, B. P.; *FEBS Lett.* **1980**, 118, 311-314;
 - b) Krylov, A. S.; Khorlin, A. A.; Grokhovsky, S. L.; Zhuze, A. L.; Gursky, G. V.; Gottikh, B. P.; *Dokl. Acad. Nauk SSSR* **1980**, 254, 234-238;
 - c) Khorlin, A. A.; Grokhovsky, S. L.; Zhuze, A. L.; Gottikh, B. P.; *Bioorg. Chim.* **1982**, 8, 1358-1364;
 - d) Neamati, N.; Mazumder, A.; Sunder, S.; Owen, J. M.; Tandon, M.; Lown, J. W.; Pommier, Y.; *Mol. Pharmacol.* **1998**, 54, 280-290;

- e) Lee, M.; Walker, C.; Cooper, M.; Forrow, S. M.; Hartley, J. A.; *J. Bioact. Compat. Polym.* **1994**, *9*, 3-28.
- [74] Literatur zum Thema „DNase I Footprinting“ sei gegeben:
- a) Senear, D. F.; Brenowitz, M.; Shea, M. A.; Ackers, G. K.; *Biochemistry* **1986**, *25*, 7344;
- b) Brenowitz, M.; Senear, D. F.; Shea, M. A.; Ackers, G. K.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 8462-8466;
- c) Brenowitz, M.; Senear, D. F.; Shea, M. A.; Ackers, G. K.; *Methods Enzymol.* **1986**, *130*, 132-181.
- [75] Guo, D.; Gupta, R.; Lown, J. W.; *Anti-Cancer Drug Des.* **1993**, *8*, 369-397.
- [76] Weitere Literaturstellen zu Lexitropsinen, die über poly-Methylen Linker Kopf-Schwanz verbrückt sind, seien gegeben:
- a) Hashimoto, S.; Itai, K.; Takeuchi, Y.; Nakamura, Y.; *Heterocycl. Commun.* **1997**, *3*, 307-315;
- b) Hashimoto, S.; Nakamura, Y.; *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 1941-1943.
- [77] Literatur zum Thema „MPE Fe^{II} Footprinting“ sei gegeben:
- a) van Dyke, M. W. V.; Hertzberg, R. P.; Dervan, P. B.; *Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 5470-5474;
- b) van Dyke, M. W. V.; Dervan, P. B.; *Biochemistry* **1983**, *22*, 2373-2377.
- [78] Bhattacharya, S.; Santanu, T. M.; *Chem. Commun.* **2001**, *16*, 1464-1465.
- [79] Es handelt sich hierbei um relative Bindungskonstanten, die aus Verdrängungs-Experimenten mit dem DNS-bindenden bis-Benzimidazol „Höchst-33258“ ermittelt werden.
- Für Literatur zu „Höchst-33258“ siehe:
- a) Bontemps, J.; Houssier, C.; Frederiq, E.; *Nucleic Acids Res.* **1975**, *2*, 971-984;
- b) Jin, R. Breslauer, K. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 8939-8942;
- [80] neuere Literatur aus diesem sehr umfangreichen Arbeitsgebiet sei gegeben:
- a) Wang, Z.; Zimmer, C.; Lown, J. W.; Knippers, R.; *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *53*, 309-316;
- b) Sharma, S. K.; Tandon, M.; Lown, J. W.; *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *11*, 2095-2103;
- c) Fishleigh, R. V.; Fox, K. R.; Khalaf, A. I.; Pitt, A. R.; Scobie, M.; Suckling, C. J.; Urwin, J.; Waigh, R. D.; Young, S. C.; *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3257-3266;

- d) Khalaf, A. I.; Pitt, A. R.; Scobie, M.; Suckling, C. J.; Urwin, J.; Waigh, R. D.; Fishleigh, R. V.; Young, S. C.; Wylie, W. A.; *Tetrahedron* **2000**, *56*, 5225-5239;
- e) Kwok, Y.; Zhang, W.; Schroth, G. P.; Liang, C. H.; Alexi, N.; Bruice, T. W.; *Biochemistry* **2001**, *40*, 12628-12638;
- f) Sharma, S. K.; Tandon, M.; Lown, J. W.; *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 1030-1034.
- [81] Rao, K. E.; Zimmermann, J.; Lown, J. W.; *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 786-797.
- [82] Burckhardt, G.; Simon, H.; Störl, K.; Triebel, H.; Walter, A.; Lown, J. W.; Zimmer, Ch.; *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1997**, *15*, 81-95.
- [83] Borodulin, V. B.; Zasedatelev, A. S.; Gurskii, G. V.; Grokhovskii, S. L.; Gottikh, B. P.; Zhudse, A. L.; *Mol. Biol.* **1986**, *20*, 1144-1149.
- [84] Leinsoo, T. A.; Nikolaev, V. A.; Grokhovsky, S. L.; Surovaya, A. N.; Sidorova, N. Y.; Streltsov, S. A.; Zasedatelev, A. S.; Zhuze, A. L.; *Mol. Biol.* **1989**, *23*, 1616-1637.
- [85] Nikolaev, V. A.; Grokhovsky, S. L.; Surovaya, A. N.; Leinsoo, T. A.; Sidorova, N. Y.; Zasedatelev, A. S.; Zhuze, A. L.; Strahan, G. A.; Shafer, R. H.; Gursky, G. V.; *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1996**, *14*, 31-47.
- [86] Grokhovsky, S. L.; Zubarev, V. E.; *Nucleic. Acids. Res.* **1991**, *19*, 257-264.
- [87] Grokhovsky, S. L.; Zhuze, A. L.; Gottikh, B. P.; *Bioorg. Chem.* **1992**, *18*, 570-583.
- [88] Surovaya, A. N., Burckardt, G.; Grokhovsky, S. L.; Birch-Hirschfeld, E.; Gursky, G. V.; Zimmer, C.; *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1997**, *14*, 595-605.
- [89] Grokhovsky, S. L.; Surovaya, A. N., Burckardt, G.; Pismensky, V. F.; Chernov, B. K.; Zimmer, Ch.; Gursky, G. V.; *J. FEBS Lett.* **1998**, *439*, 346-350.
- [90] Surovaya, A. N., Grokhovsky, S. L.; Pismensky, V. F.; Burckardt, G.; Zimmer, C.; Gursky, G. V.; *J. Mol. Biol.* **1999**, *33*, 539-546.
- [91] Surovaya, A. N., Burckardt, G.; Grokhovsky, S. L.; Birch-Hirschfeld, E.; Nikitin, A. M.; Fritzsche, H.; Zimmer, Ch.; Gursky, G. V.; *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2001**, *18*, 689-701.
- [92] Dieser Strukturtyp wird im weiteren Verlauf der Einleitung ausführlich diskutiert.
- [93] Swalley, S. E.; Baird, E. E.; Dervan P. B.; *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1600-1607.
- [94] Trauger, J. W., Baird, E. E.; Dervan, P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3534-3535.

-
- [95] de Clairac, R. P.; Seel, C. J.; Geierstanger, B. H.; Mrksich, M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B.; Wemmer, D. E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2956-2964.
- [96] Trauger, J. W.; Baird, E. E.; Mrksich, M.; Dervan P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6160-6166.
- [97] Chen, Y.-H.; Yang, Y.; Lown, J. W.; *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1996**, *14*, 341-355.
- [98] Greenberg, W. A.; Baird, E. E.; Dervan, P. B.; *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 796-805.
- [99] Mrksich, M.; Dervan P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9892-9899.
- [100] Dwyer, T. J.; Geierstanger, B. H.; Mrksich, M.; Dervan, P. B.; Wemmer, D. E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9900-9906.
- [101] Mrksich, M.; Dervan P.B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3663-3664.
- [102] Chen, Y.-H.; Lown, J. W.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6995-7005.
- [103] Al-Said, N. H.; Lown, J. W.; *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 7577-7580.
- [104] Al-Said, N. H.; Lown, J. W.; *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 1059-1070.
- [105] Chen, H. Y.; Liu, J. X.; Lown, J. W.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2223-2228.
- [106] Chen, Y.-H.; Lown, J. W.; *Heterocycles* **1995**, *41*, 1691-1707.
- [107] Singh, M. P.; Wylie, W. A.; Lown, J. W.; *Magn. Reson. Chem.* **1996**, *34*, 55-66.
- [108] Sharma, S. K.; Tandon, M.; Lown, J. W.; *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1102-1107.
- [109] O'Hare, C. C.; Mack, D.; Tandon, M.; Sharma, S. K.; Lown, J. W.; Kopka, M. L.; Dickerson, R. E.; Hartley, J. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 72-77.
- [110] Mrksich, M.; Dervan P.B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7983-7988.
- [111] Trauger, J. W.; Baird, M.; Dervan P. B.; *Nature.* **1996**, *382*, 559-561.
- [112] White, S.; Baird, E. E.; Dervan P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6953-6961.
- [113] Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7636-7644.
- [114] Turner, J. M.; Swally, S. E.; Baird, E. E.; Dervan P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6219-6226.
- [115] Declairac, R. P. L.; Geierstanger, B.H.; Mrksich, M.; Dervan P. B.; Wemmer, D. E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7909-79016.
- [116] Woods, C. R.; Ishii, T.; Bair, K. W.; Boger, D. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2148-2152.

- [117] Parks, M. E.; Baird, E. E.; Dervan P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6147-6159.
- [118] Swally, S. E.; Baird, E. E.; Dervan P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1113-1120.
- [119] Baird, E. E.; Dervan P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6141-6146.
- [120] Wurtz, N. R.; Turner, J. M.; Baird, Dervan P. B.; *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1201-1203.
- [121] Herman, D. M.; Baird, E. E.; Dervan P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1382-1391.
- [122] Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan P. B.; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 1421-1423.
- [123] Parks, M. E.; Baird, E. E.; Dervan P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8198-8206.
- [124] Parks, M. E.; Baird, E. E.; Dervan P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6953-6961.
- [125] Herman, D. M.; Baird, E. E.; Dervan P. B.; *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 975-983.
- [126] Weyermann, P.; Dervan, P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6872-6878.
- [127] Wu, H.; Crothers, D. M.; *Nature* **1984**, *308*, 509-513.
- [128] Goodsell, D. S.; Kopka, M. L.; Cascio, D.; Dickerson, R. E.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 2930-2934.
- [129] Kahn, J. D.; Yun, E.; Crothers, D. M.; *Nature* **1994**, *368*, 163-166.
- [130] Hanson, M. R.; Hurley, L. H.; *Science* **1996**, *29*, 249-251.
- [131] Turner, J. M.; Swalley, S. E.; Baird, E. E.; Dervan, P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6219-6226.
- [132] Cho, J.; Parks, M.; Dervan P. B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 10389-10392.
- [133] Herman, D. M.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1121-1129.
- [134] Melander, C.; Herman, D. M.; Dervan P. B.; *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 4487-4497.
- [135] Neuere Übersichtsliteratur zu diesem Thema sei gegeben:
a) Scopes, R. K.; *Separation by Adsorption, Affinity Techniques in Protein Purification, Principles and Practice. Principles of Affinity Chromatographie*, Third Edition, Springer Verlag, New York, 1994.

- b) Jones, C.; Patel, A.; Griffin, S.; Martin, J.; Young, P.; O'Donnell, K.; Silverman, C.; Porter, T.; Chaiken, I.; *J. Chromatogr., A* **1995**, 707, 3-22;
c) Pearson, J.; *Bioseparation and Bioprocessing* **1998**, 1, 113-124;
d) Ahmed, F.; Cole, K. D.; *Separation and Purification Methods* **2000**, 29, 1-25.
- [136] König, B.; Buchholz, H.; Rödel, M.; Patent DE 198 05 431.9, EP, JP und US Patent anhängig.
- [137] Baird, E. E.; Dervan, B. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6141-6146.
- [138] Bezüglich der IUPAC-Nomenklatur der Verbindungen sei auf die angegebene Literaturstelle verwiesen.
- [139] Merrifield, R. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.
- [140] Eine Auswahl neuerer Literatur zum Thema Schutzgruppen für die α -Amino-Funktion sowie allg. zum Thema Schutzgruppen in der Festphasen-Peptidsynthese sei gegeben:
a) Greene, T. W. and Wuts, P. G. M.; *Protective Groups in Organic Synthesis*, Third Edition, Wiley, New York, 1999.
b) J. D. Wade in *Solid Phase Synthesis*, ed. S. A. Kates and F. Albericio, Marcel Dekker, New York, 2000.
c) Jarowicki, K.; Kocienski, P.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2001**, 18, 2109-2135;
d) Elmore, D. T.; *Amino Acids, Peptides and Proteins*, **2001**, 32, 107;
e) Orain, D.; Ellard, J.; Bradley, M.; *J. Comb. Chem.*, **2002**, 1-14.
- [141] Carpino, L. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 98-101.
- [142] Carpino, L. A.; Han, G. Y.; *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 5748-5749.
- [143] Einen Überblick über verschiedene Kupplungsstrategien liefert:
Jakubke, H.-D.; *Peptide-Chemie und Biologie*; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996.
- [144] a) Mitchell, A. R.; Kent, S. B. H.; Engelhard, M.; Merrifield, R. B.; *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2845-2852;
b) Tjoeng, F. S.; Heavner, G. A.; *Synthesis* **1981**, 897-901;
c) Plaue, S.; Heissler, D.; *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 1401-1403.
- [145] Kocienski, P. J.; *Protecting Groups*; Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1994.
- [146] Kaiser, E.; Colescott, L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I.; *Anal. Biochem.* **1970**, 34, 595-598.

- [147] Eine genaue Beschreibung der verwendeten HPLC-Analytik findet sich in Kapitel 1.2 des Experimentellen Teils dieser Arbeit.
- [148] Das Fractogel[®] EMD Epoxy (Katalog-Nr. 1.16279.0015, Partikelgröße 20-40µm) wurde von der Firma Merck KG, Darmstadt zur Verfügung gestellt.
- [149] Novagen, Kat.-Nr. 70742-3 (Katalog 2000).
- [150] Merck, Kat.-Nr. 1.10316, Partikelgröße 40-90µm.
- [151] Turner, A. P. F.; *Science* **2000**, *290*, 1315-1317.
- [152] Neuere Literatur zu diesem Thema sei gegeben:
- a) Ostuni, E.; Lin, Y.; Whitesides, G. M.; *Colloids and Surfactants, B* **1999**, *15*, 3-30;
 - b) Ulman, A.; Kang, J. F.; Shnidman, Y.; Liao, S.; Jordan, R.; Choi, G.-Y.; Zaccaro, J.; Myerson, A. S.; Rafailovich, M.; Sokolov, J.; Fleischer, C.; *Rev. Mol. Biotechnol.* **2000**, *74*, 175-201;
 - c) Chaki, N. K.; Vijayamohanan, K.; *Biosensors and Bioelectronics* **2002**, *17*, 1-12.
- [153] Rubinstein, I.; Steinberg, S.; Tor, Y.; Shanzer, A.; Sagiv, J.; *Nature* **1988**, *332*, 426-428.
- [154] Hall, D.; *Anal. Biochem.* **2001**, *288*, 109-125.
- [155] Wang, J.; Cai, X.; Rivas, G.; Shiraishi, H.; Farias, P. A. P.; Dontha, N.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2629-2634.
- [156] Mascini, M.; Palchetti, I.; Marrazza, G.; *J. Anal. Chem.* **2001**, *369*, 15-21.
- [157] Patolsky, F.; Lichtenstein, A.; Willner, I.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 418-419.
- [158] Chemla, Y. R.; Grossman, H. L.; Poon, Y.; McDermott, R.; Stevens, R.; Alper, M. D.; Clarke, J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 14268-14272.
- [159] Raiteri, R.; Grattarola, M.; Butt, H.-J.; Skladal, P.; *Sens. Actuators, B* **2001**, *B79*, 115-126.
- [160] Natsume, T.; Nakayama, H.; Isobe, T.; *Trends Biotechnol.* **2001**, *19*, S28-33.
- [161] Jung, L. S.; Shumaker-Parry, J. S.; Campell, C. T.; Yee, S. S.; Gelb, M. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4177-4184.
- [162] Wood, R. W.; *Phil. Magm.* **1902**, *4*, 396-401.
- [163] Kretschmann, E.; Raether, H.; *Z. Naturforsch.* **1968**, *23A*, 2135-2136.
- [164] Otto, A.; *Physika Status Solidi* **1968**, *26*, K99-K101.
- [165] Neuere Literatur zu diesem Thema sei gegeben:

- a) Schuck, P.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, *8*, 498-501;
b) Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G.; *Sens. Actuators, B* **1999**, *54*, 3-15;
c) Rich, R. L.; Myszka, D. G.; *Curr. Opin. Biotech.* **2000**, *11*, 54-61;
d) McDonnell, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 572-577;
e) Homola, J.; Sinclair, S.; Myszka, D. G.; in *Optical Biosensors-Present and Future*; ed. Ligler, F. S.; Frances, S.; Rowe Taitt, C. A.; Elsevier Science, Amsterdam, 2002, 207-251.
- [166] Lee, M.; Rhodes, L.; Wyatt, M. D.; Farrow, S.; Hartley, J. A.; *Biochemistry*, **1993**, *32*, 4237-4245.
- [167] Cheng, C.C.; Kuo, Y.-N.; Chuang, K.-S.; Luo, C. F.; Wang, W. J.; *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1327-1330.
- [168] Die Fehlergrenze dieses Verfahrens liegt bei ± 1.0 der angegebenen Bindungskonstante.
- [169] Die Detektion erfolgt mit dem „Plasmon Imager[®]“ der Firma Biacore AB.
- [170] H. J. Schneider, Vortrag beim *International Symposium on Macrocyclic Chemistry*, Barcelona, Spanien, **1999**.
- [171] Schneider, H. J.; Rrammo, J.; Hettich, R.; *Chem. Commun.* **1996**, 105-107.
- [172] Chin, J.; Zou, X.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 223-225.
- [173] Chin, J.; Banaszczyk, M.; Zou, X.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 186-190.
- [174] Hettich, R.; Schneider, H. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5638-5647.
- [175] Moss, R.; Ragunathan, M.; *Langmuir* **1999**, *15*, 107-110.
- [176] Pelka, M.; *Dissertation*, Universität Braunschweig, **2000**.
- [177] Rödel, M.; *Dissertation*, Universität Braunschweig, **2000**.
- [178] Lown, J. W.; Krowicki, K.; *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3774-3779.
- [179] Das 1,4,7-Tris-*tert*-butyloxycarbonyl-1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecan wird nach einer literaturbekannter Vorschrift synthetisiert:
Brandes, S.; Gros, C.; Denat, F.; Pullumbi, P.; Guillard, R.; *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1996**, *133*, 65-73.
- [180] Koike, T.; Gotoh, T.; Aoki, S.; Kimura, E.; Shiro, M.; *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *270*, 424-432.
- [181] Fuchs, A.; *Diplomarbeit*, Universität Regensburg, **2001**.
- [182] Bauer, H. F.; Drikard, W. C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 5031-5032.
- [183] Traylor, T. G. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 265-274.

- [184] Collman, J. P.; Zhang, X. *Functional analogs of the oxygen binding and activating heme proteins* in *Compr. Supramol. Chem. Vol. 5*; ed. Suslick, K. S.; Elsevier Science, Oxford, 1996.
- [185] Paveltich, N. P.; Pabo, C. O. *Science* **1993**, *261*, 1701-1707.
- [186] Christianson, D. W.; Fierke, C. A. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 331-339.
- [187] Kimura, E.; Shionoya, M.; Hoshino, A.; Ikeda, T.; Yamada, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10134-10137.
- [188] Kimura, E. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 171-179.
- [189] Kimura, E.; Kikuta, E. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 139-155.
- [190] Weiss, J. *J. Incl. Phen. Macrocycl. Chem.* **2001**, *40*, 1-22.
- [191] Über dieses Themengebiet wurde erst kürzlich ein Übersichtsartikel publiziert: Reichenbach-Klinke, R.; König, B.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 121-130.
- [192] Kimura, E.; Shiota, T.; Koike, T.; Shiro, M.; Kodama, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5805-5811.
- [193] Mock, W. L.; Tsay, J. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 8635-8643.
- [194] Shionoya, M.; Kimura, E.; Shiro, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6730-6737.
- [195] Kimura, E.; Koike, T.; *Chem. Commun.* **1998**, 1495-1496.
- [196] König, B.; Pelka, M.; Zieg, H.; Ritter, T.; Bouas-Laurent, H.; Bonneau, R.; Desvergne, J.-P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1681-1687.
- [197] Koike, T.; Takashige, M.; Kimura, E.; Fujioka, H.; Shiro, M.; *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 617-623.
- [198] Kimura, E.; Murata, M.; Katsube, N.; Koike, T.; Kikuta, E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5426-5436.
- [199] Cha, G.; Meyerhoff, M. E. *Anal. Biochem.* **1988**, *168*, 216-227.
- [200] Massolini, G.; De Lorenzi, E.; Calleri, E.; Tabolotti, E.; Caccialanza, G. *J. Chromatogr. B* **2000**, *738*, 343-355.
- [201] Hustad, S.; Ueland, P. M.; Schneede, J. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 862-868.
- [202] Lam, H. R.; Tarding, F. ; *J. Chromatogr.* **1988**, *426*, 358-364.
- [203] Die genauen Messdaten und Parameter finden sich im Experimentellen Teil (Kapitel D) dieser Arbeit.
- [204] Die Messungen mussten bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Unter diesen Bedingungen unterliegen die Kohlenstoffe des Cyclen-Ringes größeren Schwingungen.

-
- [205] Grimm, H. G.; *Z. Electrochem.* **1925**, *31*, 474.
- [206] Gritter, R. J.; Bobbitt, J. M.; Schwarting, A. E.; *Einführung in die Chromatographie*; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1978.
- [207] Gottwald, W. in *RP-HPLC für Anwender aus der Reihe: Die Praxis der instrumentellen Analytik*; ed. Gruber, U.; Klein, W.; VCH Verlag, Weinheim, 1993, 77.
- [208] Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; *Introduction to Modern Liquid Chromatographie*; Wiley, New York, 1979,
- [209] Maitra, S.; Nowick, J. S.; in *The Amide Linkage: Structural Significance in Chemistry, Biochemistry, and Materials Science*; ed. Greenberg, A.; Breneman, C. M.; Liebman, J. F.; Wiley, New York, 2000, Kapitel 15.
- [210] Selkoe, D. J.; *Neuropath. Exp. Neurol.* **1994**, *53*, 438-447.
- [211] Lansbury, P. T. Jr.; *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 317-321.
- [212] Harper, J. D.; Lansbury, P. T.; *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *359*, 385-407.
- [213] Verbeek, M. M.; Ruiter, D. J.; de Waal, R. M. W.; *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 937-950.
- [214] Cohen, F. E.; Pan, K.-M.; Huang, Z.; Baldwin, M.; Fletterick, R. J.; Prusiner, S. B.; *Science* **1994**, *264*, 530-531.
- [215] Lansbury, P. T. Jr.; *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 1-5.
- [216] Ng, S. B. L.; Doig, A. J.; *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 425-432.
- [217] Prusiner, S. B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 13363-13383.
- [218] Nowick, J. S.; *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 287-296.
- [219] Stigers, K. D.; Soth, M. J.; Nowick, J. S.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 714-723.
- [220] Nowick, J. S.; Tsai, J. H.; Quoc-Chuong, D. B.; Maitra, S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8409-8410.
- [221] Nowick, J. S.; Chung, D. M.; Maitra, K.; Maitra, S.; Stigers, K. D.; Sun, Y.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7654-7661.
- [222] Nowick, J. S.; Cary, J. M.; Tsai, J. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5176-5180.
- [223] Nowick, J. S.; Smith, E. M.; Ziller, J. W.; Shaka, A. J.; *Tetrahedron* **2002**, *58*, 727-739.
- [224] Nowick, J. S.; Lam, K. S.; Khasanova, T. V.; Kemnitzer, W. E.; Maitra, S.; Mee, H. T.; Liu, R.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4972-4973.

- [225] Schrader, T., Kirsten, C.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1996**, 2089-2090.
- [226] Schrader, T., Kirsten, C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12061-12068.
- [227] Kim, C. A.; Berg, J. M.; *Nature* **1993**, *362*, 267-270.
- [228] Hierzu sei auf die Einleitung (Kapitel A) dieser Arbeit verwiesen.
- [229] Für Details zu den verwendeten Rechen-Methoden sei auf den Experimentellen Teil (Kapitel D) dieser Arbeit verwiesen.
- [230] Elguero, J.; Marzin, C.; Katritzky, A. R.; Linda, P.; *The Tautomerism of Heterocycles*; ed. Katritzky, A. R.; Boulton, A. J.; Academic Press, New York, 1976.
- [231] Katritzky, A. R.; Rees, C. W.; *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*; ed. Potts, K. T.; Pergamon Press, Oxford, Vol. 5, 1984.
- [232] Gupta, R. R.; Kumar, M.; Gupta, V.; *Heterocyclic Chemistry II*; Springer Verlag, Berlin, Vol. 2, 1999.
- [233] Borsche, W.; Manteuffel, R.; *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1934**, *512*, 102-106.
- [234] Tsai, C.-C.; Wang, L.-Y.; Huang, L.-J.; Teng, C.-M.; Lin, T.-P.; Li, H.T.; Kuo, S.-C.; *Chin. Pharm. J.* **1995**, *47*, 407-419.
- [235] Lee, F.-Y.; Lien, J.-C.; Huang, L.-J.; Huang, T.-M.; Tsai, S.-C.; Teng, C.-M.; Wu, C.-C.; Kuo, S.-C.; *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3746-3749.
- [236] Die genauen Messdaten und Parameter finden sich im Experimentellen Teil (Kapitel D) dieser Arbeit.
- [237] Carpino, L. A.; Cohen, B. J.; Stephens, K. E.; Sadat-Aalae, S. Y.; Tien, J. H.; Langridge, D. C.; *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3732-3734.
- [238] Suhs, T.; Diplomarbeit, Universität Regensburg, **2001** und eigene Arbeiten.
- [239] Pearson, R. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533-3539.
- [240] Übersichts-Literatur zu diesem Thema sei gegeben:
Gravert, D. J.; Janda, K. D.; *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 489-509.
- [241] König, B.; Rödel, M.; *Chem. Commun.* **1998**, 605-606.
- [242] Die Verlängerung der Oligamidkette und die nachfolgenden Arbeiten auf diesem Gebiet werden von Dr. Katerina Cernovska im Rahmen eines Post-Doktoranden Aufenthaltes an der Universität Regensburg durchgeführt.
- [243] Einen Überblick über die Anwendung von orthogonalen Schutzgruppentaktiken liefert:
Albericio, F.; *Biopolymers* **2000**, *55*, 123-139.

- [244] Rzepecki, P.; *Dissertation*, Universität Marburg, in Vorbereitung.
- [245] Sieber, P.; *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2107-2110.
- [246] Maddar, A.; Farcy, N.; Hosten, N. G. C.; De Muynck, H.; De Clercq, P. J.; Barry, J.; Davis, A. P.; *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 11, 2787-2791.
- [247] Fields, G. B.; Noble, R. L.; *Int. J. Peptide. Protein Res.* **1990**, 35, 161.
- [248] Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Mathä, B.; Lohof, E.; Hölzemann, G.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H.; *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3033-3040.
- [249] Carpino, L. A.; El-Faham, A.; *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 3561-3564.
- [250] Carpino, L. A.; Ionescu, D.; El-Faham, A.; *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2460-2465.
- [251] Carpino, L. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397-4398.
- [252] Carpino, L. A.; Imazumi, H.; Foxman, B. M.; Vela, M. J.; Henklein, P.; El-Faham, A.; Klose, J.; Bienert, M.; *Org. Lett.* **2000**, 2, 2253-2256.
- [253] Schneider, H. J.; Kramer, R.; Simova, S.; Schnieder, U.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6442-6448.
- [254] Wilcox, C. S. in *Frontiers in Supramolecular Chemistry and Photochemistry*; ed. Schneider, H. J.; Dürr, H.; VCH, Weinheim, 1991, 123.
- [255] Soto, C.; Sigurdsson, E. M.; Morelli, L.; Kumar, R. A.; Castano, E. M.; Frangine, B.; *Nature. Med.* **1998**, 4, 822-826.
- [256] Wang, S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 1328-1331.
- [257] Maksimovic, Z. B.; Reichardt, C.; Spiric, A.; *Z. Anal. Chem.* **1974**, 270, 100-104.
- [258] Marcus, Y.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, 1015-1021.
- [259] Reichardt, C.; *Solvents and Solvents Effects*; VCH, Weinheim, 1988.
- [260] Übersichtsliteratur zur CD-Spektroskopie sei gegeben:
a) Snatzke, G.; *Chem. Unserer Zeit* **1981**, 79-87;
b) Snatzke, G.; *Chem. Unserer Zeit* **1982**, 161-168.
- [261] Prof. Dr. A. Geyer, Universität Regensburg, persönliche Mitteilung.
- [262] Kessler, H.; *Angew. Chem.* **1982**, 94, 509-520.
- [263] Chen, C. W.; Whitlock Jr.; H. W.; *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 4921-4922.
- [264] Zimmermann, S. C.; Wu, W.; Zeng, Z.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 196-201.
- [265] Davies, M.; Bonnat, M.; Guiller, F.; Kilburn, J. D.; *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 8696-8703.
- [266] Fessmann, T.; Kilburn, J. D.; *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2170; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 111, 2170-2174;

- [267] Jensen, K. B.; Braxmeier, T.; Demarcus, M.; Frey, J. G.; Kilburn, J. D.; *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 1300-1309.
- [268] Chang, S.-K.; E.; Hamilton, A. D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 113, 1318-1319.
- [269] Chang, S.-K.; Engen, D. V.; Fan, E.; Hamilton, A. D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7640-7645.
- [270] Übersichtsliteratur zum Thema Combinatorische Chemie sei gegeben:
- a) Furka, Á. in *Advanced Chemtech Handbook of Combinatorial & Solid Phase Organic Chemistry*; ed. Bennett, W. D.; Christensen, J. W.; Hamaker, L. K.; Peterson, M. L.; Rhodes, M. R.; Saneii, H. H.; Advanced ChemTech, Inc., Louisville, Kentucky, 1994.
- b) Furka, Á; Christensen, J. W.; Healy, E.; Tanner, H. R.; Saneii, H. H.; *J. Comb. Chem.* **2000**, 2, 220-223.
- [271] Hirst, S. C.; Tecilla, P.; Geib, S. J.; Fan, E.; Hamilton, A. D.; *Israel J. Chem.* 1992, 32, 105-111.
- [272] Schlitzer, M.; Sattler, I.; *Eur. J. Chem.* **2000**, 35, 721-726.
- [273] Kruppa, M.; *Diplomarbeit*, Universität Regensburg, **2002**.
- [274] a) Autorenkollektiv, *Organikum*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, 17. Auflage, Berlin, **1988**;
- b) Hünig, S; Märkl, G.; Sauer, J., *Einführung in die apparativen und spektroskopischen Methoden in der Organischen Chemie*, Regensburg, Würzburg, **1990**.
- [275] Wavefunction Inc., 18401 Von Karmann Ave., Suite 370, Irvine, CA 92612.
- [276] Stewart, J. J. P.; *J. Comput. Chem.* **1989**, 10, 209-220.
- [277] Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Hyperquad 2000*; University of Leeds, Leeds, 2000.
- [278] Altomare, A.; Cascarano, G.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A. *J. Appl. Cryst.* **1993**, 26, 343-350.
- [279] Sheldrick, G. M. *Programm für Kristallstrukturverfeinerung*, Universität Göttingen, 1997.
- [280] Barlos, K.; Chatzi, O.; Gatos, D.; Stravropulos, G.; *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 37, 513-520.
- [281] Die Synthesen werden in dem Syntheseautomaten Peptidesynthesizer Model 90 der Firma Advanced ChemTech durchgeführt.

-
- [282] Die Abspaltung des Peptids von der festen Phase erfolgt in einem Rundkolben.
- [283] Diese Methode wurde zur direkten Kupplung zweier aliphatischer Aminosäuren verwendet.
- [284] Bei der direkten Kupplung zweier aliphatischer Aminosäuren kann die Kupplungszeit deutlich verkürzt werden.

G Anhang

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften:

- Bispyrene based chiroptical molecular redox switch
Westermeier, C.; Gallmeier, H.-C.; Komma, M.; Daub, J.; *Chem. Commun.* **1999**, 2427.
- Selective Binding and reversible Release of Riboflavin by Polymer-bound Zinc(II) Azamacrocycles
König, B.; Gallmeier, H.-C.; Reichenbach-Klinke, R.; *Chem. Commun.* **2001**, 2390.

Posterpräsentationen:

- Molekulare Erkennung von DNS-Doppelsträngen – Entwicklung einer basen-sequenzspezifischen Biochromatographie
12.Vortragstagung ORCHEM 2000, Bad Nauheim, **2000**.
- Lösungs- und Festphasensynthese von unnatürlichen Peptiden auf der Basis der 3-Aminopyrazol-5-carbonsäure zur Erkennung von β -Faltblattstrukturen
13.Vortragstagung ORCHEM 2002, Bad Nauheim, **2002**.
- Unnatural Peptides based on 3-Aminopyrazole-5-carboxylic acids: Synthesis and binding properties with β -sheet structures of peptides
Summer School “Medicinal Chemistry” of the International Quality Network (IQN), Regensburg, **2002**.

Vorträge:

- Molekulare Erkennung von DNS-Doppelsträngen – Entwicklung einer basen-sequenzspezifischen Biochromatographie
Weihnatskolloquium des Instituts für Organische Chemie der Universität Regensburg, **1999**.

- Molekulare Erkennung von DNS-Doppelsträngen – Entwicklung einer basensequenzspezifischen Biochromatographie
12.Vortragstagung ORCHEM 2000, Bad Nauheim, **2000**.
- Wege zur Entwicklung eines Biosensors für die sequenzspezifischen Erkennung von dDNS in Lösung
Vortrag bei der Firma Graffinity, Heidelberg im Rahmen einer gemeinsamen Kooperation, **2000**.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Hans-Christoph Gallmeier
Geburtsdatum	05. November 1972
Geburtsort	Regensburg
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schul Ausbildung:

1979 – 1983	Placidus-Heinrich Volksschule in Schierling
1983 – 1992	Burkhard Gymnasium in Mallersdorf-Pfaffenberg
1992	Abitur am Burkhard Gymnasium in Mallersdorf-Pfaffenberg

Wehrdienst:

1992 – 1993	Grundwehrdienst bei der Luftwaffe in Roth und Regensburg
-------------	--

Hochschulausbildung:

11/1993 – 06/1999	Studium der Chemie an der Universität Regensburg
04/1996, 10/1996	Wahlfach Technische Chemie (Dechema/Frankfurt und Universität Regensburg)
10/1995	Vordiplomsprüfung
05/1998	Diplomprüfung
06/1998 – 06/1999	Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg bei Prof. Dr. J. Daub (Thema: „Elektronenübertragung und Chiralität: Elektronen-transferaktive Aminosäurederivate und chirale trans-Cyclohexane“)

09/1999 – 12/2002	Promotion am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg bei Prof. Dr. B. König (Thema: „Synthese und Eigenschaften heteroaromatischer Oligoamide zur molekularen Erkennung von DNS und Peptiden“)
08/2001	Teilnahme an der „102nd Summerschool“ der BASF, Ludwigshafen
03/2002 – 06/2002	Forschungsaufenthalt an der Rutgers University, New Jersey/USA, bei Prof. Dr. L. Jimenez

H Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für das überaus angenehme Arbeitsklima und ihre stete Hilfsbereitschaft bedanken.

Für die gute Zusammenarbeit und Kooperation im Rahmen dieser Arbeit bedanke ich mich bei

Dr. R. Hedriks und Dr. M. Schulte, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Dr. H. Rau, Graffinity, Heidelberg, Deutschland

Prof. Dr. T. Schrader, Philipps-Universität, Marburg, Deutschland

Prof. Dr. L. Jimenez, Rutgers University, New Jersey, USA

Den Mitarbeitern der Zentralen Analytik der Fakultät für Chemie und Pharmazie danke ich für die schnelle und gewissenhafte Durchführung der analytischen Messungen. Insbesondere Herrn Dr. T. Burgemeister, Herrn F. Kastner, Frau N. Pustet, Frau A. Schramm und Frau G. Stühler für die Aufnahme der NMR-Spektren, Herrn Dr. K. K. Mayer, Herrn J. Kiermaier und Herrn W. Söllner für die Messung der Massenspektren, Herrn G. Wandinger, Frau S. Stempfhuber und Herrn H. Schüller für die Durchführung der Elementaranalysen und Herrn Dr. M. Zabel für die Röntgenstrukturanalysen.

Herrn Prof. Dr. O. S. Wolfbeis danke ich für die Möglichkeit zur Nutzung des CD-Spektrometers, Herrn Prof. Dr. A. Mannschreck für die Möglichkeit der Verwendung des Polarimeters, Herrn Prof. Dr. O. Reiser für die Nutzung des IR-Spektrometers.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Dr. R. Vasold für die Durchführung der HPLC-Messungen und viele hilfreiche Tipps.

Meinen Laborkollegen Wolfgang Pitsch, Roland-Reichenbach-Klinke, Stefan Miltschitzky und Thorsten Graf für das ausgezeichnete Laborklima und die netten fachlichen und privaten Gespräche.

Danksagung

Prof. Dr. Armin Geyer, Daniela Fischer und Peter Tremmel für ihre stete Hilfsbereitschaft in allen NMR-technischen Fragen.

Den mit „Adleraugen“ ausgestatteten Kollegen Stefan Miltschitzky, Michael Kruppa und Jörg Strauß für das anstrengende Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Christian Geiger für die durchgeführten Arbeiten im Rahmen eines Schwerpunktpraktikums.

Meinen Kollegen Michael Subat und Roland Reichenbach-Klinke für die erfolgreichen Kooperationen.

Frau Petra Rzepecki, meiner Pyrazol-Leidensgenossin, für die erfolgreiche Kooperation und die Möglichkeit, das schöne Marburg zu besuchen.

Meinen langjährigen Studienfreunden und Mitstreitern Thomas Zwack, Jörg Strauß und Jürgen Klankermayer für ihre Hilfsbereitschaft, ihre Freundschaft und die unzähligen fachlichen und privaten Gespräche während unserer täglichen Mittagsrunde.

Meiner lieben Steffi für ihre Fähigkeit, mich immer wieder aufzuheitern und die 1000 kleinen Dinge, die das Leben so schön machen.

Meiner „kleinen“ Schwester Simone für willkommene Abwechslungen im Studiums- und Promotionsstress und nette Regensburg-Besuche.

Meinem Bruder Stefan, der mich wo es ging unterstützte, für viele Kneipen-Touren durch die Regensburger-Szene und einen wunderschönen Amerika-Urlaub.

Meiner Großeltern Helene und Jakob, die mir während meiner Studienzeit immer wieder finanziell unter die Arme griffen und immer für mich da waren.

Zuletzt, aber vor allem, meinen Eltern für ihre außergewöhnliche Unterstützung und ihren finanziellen und privaten Rückhalt während meiner gesamten Ausbildung.